

STIC Translation Branch Request Form for Translation

Phone: 308-0881 Crystal Plaza 1/4. Room 2C15 <http://ptoweb/patents/stic/stic-transhome.htm>

SPE Signature Required for RUSH

Information in shaded areas marked with an * is required

Fill out a separate Request Form for each document

*U. S. Serial No. : _____

*Requester's Name: RUSSELL NEGIN Phone No.: 571-272-1083

Office Location: REMSEN 2054 Art Unit/Org. : 1631

Is this for the Board of Patent Appeals? NO

Date of Request: 10/25/05

*Date Needed By: 11/15/05

(Please indicate a specific date)

Document Identification (Select One):

Note: If submitting a request for patent translation, it is not necessary to attach a copy of the document with the request.

If requesting a non-patent translation, please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form and submit it at your EIC or a STIC Library.

1. X Patent *Document No. WO 94/08014
*Country Code FR
*Publication Date 4/14/94
*Language French

No. of Pages _____ (filled by STIC)

2. _____ Article *Author _____
*Language _____
*Country _____

3. _____ Other *Type of Document _____
*Country _____
*Language _____

Translations Branch
The world of foreign prior art to you.



To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

- > Will you accept an English Language Equivalent? (Yes/No) _____
> Would you like to review this document with a translator prior to having a complete written translation? (Translator will call you to set up a mutually convenient time) Yes/No _____
> Would you like a Human Assisted Machine translation? YES (Yes/No) _____
Human Assisted Machine translations provided by Derwent/Schreiber is the default for Japanese Patents 1993 onwards with an Average 5-day turnaround.

STIC USE ONLY

Copy/Search

Processor: _____
Date assigned: _____
Date filled: _____
Equivalent found: (Yes/No) _____

Doc. No.: _____
Country: _____

Translation

Date logged in: _____
PTO estimated words: _____
Number of pages: _____
In-House Translation Available: _____

In-House
Translator: _____
Assigned: _____
Returned: _____

Contractor:
Name: _____
Priority: _____
Sent: _____
Returned: _____





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/52, 15/76, 15/54 C12N 1/21, 9/10, 9/00 C12N 15/53, 9/06, C12P 21/04 C12P 17/18 // C07K 7/06 C07K 5/06 (C12P 21/04 C12R 1:465)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/08014 (43) Date de publication internationale: 14 avril 1994 (14.04.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00923 (22) Date de dépôt international: 25 septembre 1993 (25.09.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/11441 25 septembre 1992 (25.09.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BLANC, Véronique [FR/FR]; 247, avenue Daumesnil, F-75012 Paris (FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 48-52, rue des Meuniers, F-75012 Paris (FR). JACQUES, Nathalie [FR/FR]; 16, rue Plumet, F-75015 Paris (FR). LA-CROIX, Patricia [FR/FR]; 54, avenue de Rigny, F-94360 Bry-sur-Marne (FR). THIBAUT, Denis [FR/FR]; 28, rue Jean-Colly, F-75013 Paris (FR). ZAGOREC, Monique [FR/FR]; 19, rue du Mail, F-75002 Paris (FR).		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, FI, JP, KR, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: POLYPEPTIDES INVOLVED IN STREPTOGRAMIN BIOSYNTHESIS, NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR SAID POLYPEPTIDES AND USE THEREOF (54) Titre: POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET LEUR UTILISATION (57) Abstract The invention concerns nucleotide sequences coding for a polypeptide involved in Streptogramin biosynthesis, recombinant cells containing said sequences, and use thereof. (57) Abrégé La présente invention concerne les séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, les cellules recombinantes contenant de telles séquences, et leurs utilisations.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

**POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES. SEQUENCES
NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET LEUR UTILISATION**

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines et comprend également l'isolement et l'identification de gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines, l'expression de ces gènes dans le but d'augmenter les taux de production et leur utilisation pour la construction de mutants bloqués pouvant conduire à la synthèse de nouveaux antibiotiques ou à des formes dérivées de Streptogramines.

Les Streptogramines forment un groupe homogène d'antibiotiques constitués d'une association de deux types de molécules chimiquement différentes; d'une part des macrolactones polyinsaturées (composants du groupe A, dont deux exemples de structures sont présentées figure 1) et d'autre part, des depsipeptides (composants du groupe B, dont trois exemples de structure sont présentés sur la figure 2). Ce groupe comprend de nombreux antibiotiques (cf. tableau 1 et figure 3) connus sous différents noms en fonction de leur origine dont les Pristinamycines, les Mikamycines, les Virginiamycines (pour une revue, voir Cocito 1979, 1983).

Les composants A et B ont une activité antibactérienne synergique qui peut atteindre 100 fois celle des composants séparés et qui, contrairement à celle de chaque composant, est bactéricide (Cocito 1979). Cette activité est plus particulièrement efficace contre les bactéries Gram-positives, comme les Staphylocoques et Streptocoques (Cocito 1979, Videau 1982). Les composants A et B inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome (Cocito 1979 ; pour une revue, voir Di Giambattista et al. 1989).

Les Streptogramines sont essentiellement produites par des Actinomycètes dont de nombreux Streptomycètes, présentés dans le tableau 1. En outre, les Streptogramines sont aussi synthétisées par des eucaryotes tel que Micromonospora qui synthétise les Vernamycines. Les Actinomycètes constituent un groupe de microorganismes très intéressant du fait de la quantité importante de métabolites secondaires qu'ils produisent, parmi lesquels de nombreux antibiotiques (Beta-lactames, Tétracyclines, Macrolides, Aminoglycosides, Polyacétates, etc), des herbicides, des anti-cancéreux, des antifongiques, des immunomodulateurs, des inhibiteurs d'enzymes. De nombreuses voies de biosynthèse, concernant des antibiotiques appartenant à des classes variées ainsi que d'autres métabolites secondaires tels que des pigments (pour une revue, Chater 1990), ont à ce jour déjà été étudiées chez les Actinomycètes. Un aspect important de ce groupe de bactéries,

est que les gènes impliqués dans une même voie de biosynthèse, gènes de structure, mais également, gène(s) de résistance et gène(s) de régulation, sont groupés physiquement sur le chromosome, constituant des clusters, pouvant atteindre plus de 100 kb (Hopwood *et al.* 1986a, Hopwood *et al.* 1986b, Hallam *et al.* 1988, Anzai *et al.* 1987, Ohnuki *et al.* 1985). A ce jour aucun exemple n'est venu contredire cette constatation. Une telle organisation structurale présente un intérêt important dans le développement des stratégies de clonage des gènes de biosynthèse. En effet, il est possible, à partir d'un seul gène préalablement cloné par des techniques diverses, gène de biosynthèse, de résistance ou de régulation, de marcher le long du chromosome et d'isoler ainsi l'ensemble des gènes du cluster de biosynthèse.

La connaissance des voies de biosynthèse de chacun des composants des Streptogramines n'est que très partielle à ce jour, mais l'origine des différentes parties de chaque molécule a été identifiée par marquage radioactif (Kingston *et al.* 1983). Ainsi, les composants de type A sont formés de deux régions provenant de la condensation d'acétates et de plusieurs acides aminés tels que la sérine, la glycine, par exemple. En ce qui concerne les composants de type B, des études ont montré que tous les acides aminés présents dans la chaîne peptidique dérivent des acides aminés naturels (Hook et Vining 1973). Toutefois, aucun polypeptide impliqué dans ces voies n'a été purifié en quantité suffisante à ce jour pour permettre sa caractérisation moléculaire, et aucun gène de biosynthèse n'a été décrit. Dans le processus de biosynthèse des composants de type B deux parties peuvent être distinguées:

1) Synthèse des précurseurs, ou de leurs analogues, du macrocycle: acide 3-hydroxypicolinique, acide L-2-aminobutyrique, p-diméthylamino-L-phénylalanine, acide 4-oxo-L-pipecolique, L-phénylglycine.

2) Formation du macrocycle à partir des précurseurs cités ci-dessus, de la L-threonine et de la L-proline, ou de leurs analogues, avec éventuellement modification de ces précurseurs ou N-méthylation peptidique.

A ce jour seule l'origine métabolique probable des précurseurs du macrocycle des composants de type B a été déterminée par des études utilisant des isotopes marqués (Reed *et al.*, 1986, Molinero *et al.*, 1989, Reed *et al.*, 1989):

La présente invention résulte de la purification de polypeptides intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines ainsi que du clonage de gènes dont le

produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines. Il est entendu que le terme biosynthèse des Streptogramines comprend les gènes régulateurs et les gènes conférant la résistance aux microorganismes producteurs. La présente invention permet ainsi d'augmenter les taux de production de ces métabolites -grâce aux techniques d'ADN recombinant. Un autre intérêt de la présente invention réside dans la possibilité, par construction de mutants bloqués dans les différentes étapes de cette biosynthèse, de produire des intermédiaires de synthèse de chacun des deux composants. Ces intermédiaires peuvent servir de substrats à de nouvelles modifications, par voie chimique, biochimique, enzymatique ou microbiologique. De même l'isolement des gènes de biosynthèse permet, par transfert des gènes entre souches productrices, de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989). Un autre intérêt de la présente invention réside dans le fait qu'elle apporte une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des métabolites classés comme des Streptogramines. En effet, l'invention permet de construire des souches bactériennes ou fongiques dans lesquelles on exprime, sous le contrôle de signaux d'expression appropriés, une ou plusieurs protéines intervenant dans la biosynthèse des Streptogramines. De telles souches peuvent alors être utilisées pour réaliser des bioconversions. Ces bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires des dites cellules. Ces bioconversions peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée, avec une enzyme d'une voie de biosynthèse. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de biosynthèse.

Un premier objet de l'invention concerne donc une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

Plus particulièrement, plusieurs gènes dont le produit intervient dans la biosynthèse des Streptogramines ont été isolés à partir de Streptomyces pristinaespiralis. Les Streptogramines produites par cette souche étant plus communément désignées par le terme Pristinamycines (Cf tableau 1), dans ce qui suit, référence sera faite dans certains cas aux gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Mais il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines. Les Pristinamycines I et II correspondent respectivement aux composants B et A des Streptogramines. Les molécules de la famille des

Pristinamycines II et de la famille des Pristinamycines I, désignent donc dans ce qui suit les composants A et B des Streptogramines respectivement.

La présente invention décrit en particulier l'isolement et la caractérisation des gènes snaA, snaB, snaC, snaD, papA, papM, samS, snbA, snbC, snbD, snbE et snbR.
5 Ces gènes ont été isolés à partir d'une banque d'ADN génomique de S. pristinaespiralis. Cette banque a été obtenue par digestion partielle de l'ADN génomique de S. pristinaespiralis, par l'enzyme de restriction Sau3A. De larges fragments d'ADN, de 40 à 50 kb en moyenne, ont été clonés dans le cosmide pH79 (Hohn, B., and Collins, J. F., 1980). Après encapsidation in vitro, les souches
10 d'E.coli HB101 (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969) et DH1 (Low, 1968) ont été transfectées. La banque d'ADN de S.pristinaespiralis se trouve ainsi dans deux souches différentes d'E.coli.

Les gènes snaA, snaB et samS (initialement désigné snaC) sont présents sur le cosmide pIBV1 (figure 4). Le produit des gènes snaA et snaB, correspondant aux
15 polypeptides SnaA et SnaB, intervient dans la dernière étape de biosynthèse du composant II des Pristinamycines (conversion de la Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA) correspondant à l'oxydation de la liaison 2,3 de la D-proline. Ces deux polypeptides constituent les deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase dont la purification est décrite dans la présente invention. Le produit du
20 gène samS interviendrait dans la synthèse de la SAM (donneur de groupements méthyles) à partir d'ATP et de méthionine. Le composant A de la plupart des Streptogramines est en effet méthylé en C-4 (figure 1), et il a été décrit (Kingston et al., 1983) que ce méthyle dérive du méthyle de la méthionine, très probablement via une réaction de méthylation avec la SAM. Le gène samS coderait donc pour une
25 SAM synthase (SamS ; EC. 2.5.1.6) spécifique de la voie de biosynthèse des Pristinamycines.

Les gènes snbA, snbR, papA et papM sont présents sur le cosmide pIBV2 (figure 5). Le gène snbA correspond, d'après les études biochimiques présentées dans l'exemple 5, à la première étape de la synthèse des Pristinamycines I. Il s'agit de
30 l'activation du premier acide de la chaîne, l'acide 3-hydroxypicolinique, par adénylation. Le gène snbR pourrait intervenir dans le transport des molécules de la famille des Pristinamycines I (voire des Pristinamycines II) hors de la cellule après synthèse, conférant ainsi à la souche productrice une résistance à ce composant. Le gène papA correspond, d'après les analyses de séquence (exemple 8.8) et l'étude d'un
35 mutant disrupté dans ce gène (exemple 9.3.), à un gène de biosynthèse de la

paraaminophénylalanine à partir du chorismate. La paraaminophénylalanine est ensuite diméthylée par le produit du gène papM, une N-méthyltransférase décrite dans la présente invention, pour former la paradiméthylaminophénylalanine, qui est ensuite incorporée dans la Pristinamycine IA. Les gènes papA et papM interviennent donc dans la synthèse d'un des précurseurs de la Pristinamycine IA.

Les gènes snaA, snaD, snbC, snbD et snbE sont présents sur le cosmide pIBV3 (figure 6) qui jouxte donc le cosmide pIBV1 sur lequel le gène snaA est déjà présent. Le gène snaD code, d'après l'analyse de sa séquence (exemple 8.9.) et l'étude d'un mutant disrupté dans ce gène (exemple 9.5.), pour une peptide synthase impliquée dans la biosynthèse de la Pristinamycine II. Le gène snbC, dont le produit est décrit dans la présente invention, intervient dans l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA. Le gène snbD, dont le produit est aussi décrit dans la présente invention, est impliqué dans l'incorporation des résidus proline et paradiméthylaminophénylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA. Il gouverne aussi la N-méthylation de la liaison peptidique entre ces 2 résidus. Enfin, le gène snbE, dont le produit est aussi décrit dans la présente invention, intervient dans l'incorporation des deux derniers résidus de la Pristinamycine IA, à savoir la phénylglycine et l'acide 4-oxopipécolique.

Le gène snaC est présent sur le cosmide pIBV4 (figure 7). Il code pour une FMN:NADH oxydoréductase, désignée également FMN réductase, décrite dans la présente invention, et qui fournit à la Pristinamycine IIA synthase le FMNH₂ à partir du FMN et du NADH. Le gène snaC intervient donc dans l'étape finale de la biosynthèse de la Pristinamycine IIA.

Ces différents gènes ont été sous-clonés à partir de leur cosmide d'origine et leurs séquences nucléiques ont été déterminées. Les gènes snaA, snaB et samS, ont été sous-clonés sur un fragment BamHI-BamHI de 6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 1). Le gène snbA a été sous cloné dans un fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 5). Le gène snbR a été sous cloné dans un fragment BglII-BglII de 4.6 kb, dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 6). Une partie du gène papA a été sous clonée dans un fragment XhoI-XhoI de 3,4 kb dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 9). Le gène papM a été sous cloné dans un fragment PstI-PstI de 4,1 kb dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 10). Une partie du gène snaD a été sous clonée dans un fragment BamHI-SstI de 1,5 kb dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 8). Une partie du gène snbC a été sous clonée sur un fragment SphI-SphI de 6,2 kb dont 2 régions ont

été séquencées (SEQ ID n° 11 et 12). Une partie du gène snbD a été sous clonée sur un fragment SphI-SphI de 8,4 kb dont 2 régions ont été séquencées (SEQ ID n° 13 et 14). Une partie du gène snbE a été sous clonée sur un fragment SphI-SphI de 6,6 kb dont 2 régions ont été séquencées (SEQ ID n° 15 et 16). Le gène snaC a été sous cloné dans un fragment BamHI-BamHI de 4 kb dont une partie a été séquencée (SEQ ID n° 7).

La proximité des gènes snaA, snaB, snaD, samS, snbC, snbD et snbE d'une part; ainsi que des gènes snbA, snbR, papA et papM confirme la localisation en clusters des gènes de biosynthèse des composants A et B des Streptogramines. De plus, les 4 cosmides décrits dans la présente invention sont regroupés dans une région du chromosome d'une taille estimée à 200 kb par électrophorèse à champ pulsé, soit 3 % du génome total (7500 kb) de Streptomyces pristinaespiralis (exemple 13). Il est donc évident que les régions qui entourent les gènes identifiés dans la présente invention (snaA, snaB, snaD, samS, snbC, snbD et snbE; snbA, snbR, papA et papM; snaC), contiennent les autres gènes du cluster de biosynthèse des Pristinamycines, et que ces gènes peuvent être utilisés pour localiser les autres gènes de biosynthèse des Streptogramines.

Préférentiellement, l'invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie parmi :

(a) tout ou partie des gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 3), snaC (SEQ ID n° 7), snaD (SEQ ID n° 8), papA (SEQ ID n° 9), papM (SEQ ID n° 10), samS (SEQ ID n° 4), snbA (SEQ ID n° 5), snbC (SEQ ID n° 11 et 12), snbD (SEQ ID n° 13 et 14), snbE (SEQ ID n° 15 et 16) et snbR (SEQ ID n° 6),

(b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,

(c) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,

(d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet les séquences nucléotidiques représentées par les gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 3), snaC (SEQ ID n° 7), snaD (SEQ ID n° 8), papA (SEQ ID n° 9), papM (SEQ ID n° 10), samS (SEQ ID n° 4), snbA (SEQ ID n° 5), snbC (SEQ ID n° 11 et 12), snbD (SEQ ID n° 13 et 14), snbE (SEQ ID n° 15 et 16) et snbR (SEQ ID n° 6).

Un autre objet de l'invention concerne tout ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un ADN recombinant comprenant tout ou partie des cosmides pIBV1, pIBV2, pIBV3 ou pIBV4 tels que représentés sur les figures 4 à 7 ou tout ou partie de séquences
5 hybridant avec les cosmides pIBV1 à pIBV4 ou avec des fragments de ceux-ci.

Dans un mode préféré de l'invention, les séquences nucléotidiques définies ci-dessus font partie d'un vecteur d'expression, qui peut être à réplication autonome ou intégratif.

Comme indiqué plus haut, bien que l'invention soit plus particulièrement
10 illustrée avec les gènes de biosynthèse de la Pristinamycine, il est clair que les résultats obtenus s'appliquent à l'ensemble des Streptogramines.

Plus particulièrement, les techniques développées dans la présente invention pour purifier des protéines ou cloner des gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de *S. pristinaespiralis* peuvent être appliquées aux autres microorganismes
15 producteurs de Streptogramines (Cf tableau 1).

Ainsi, la purification d'une activité enzymatique à partir de *S. pristinaespiralis* rend possible la purification de la même activité à partir d'une autre souche productrice de Streptogramine. La présente invention peut donc être appliquée au clonage de gènes de biosynthèse de Streptogramines à partir de tout microorganisme
20 producteur par purification d'une protéine intervenant dans la biosynthèse puis, à l'aide de la séquence NH₂-terminale de celle-ci, synthèse d'une sonde oligonucléotidique qui permet de cloner le gène correspondant. Ensuite une marche sur le chromosome permet d'identifier le cluster de biosynthèse en entier.

De plus, à partir des gènes identifiés dans la présente demande, il est possible,
25 par hybridation, de cloner directement les gènes de biosynthèse des Streptogramines à partir de l'ADN d'un autre microorganisme producteur. En effet, les gènes de biosynthèse des Pristinamycines hybrident fortement à ceux des autres Streptogramines. Il est ainsi possible de cloner par hybridation les gènes de biosynthèse des Streptogramines en utilisant comme sonde les gènes *sna*, *snb* ou *pap*,
30 ou des fragments de ceux-ci, ou les fragments adjacents à ceux-ci contenant, comme il est montré dans la présente invention, d'autres gènes *sna* et *snb*. Ceci résulte du fait que: 1) les Streptogramines produites par les différents microorganismes ont des structures identiques ou similaires (voir figures 1-3), 2) les gènes de biosynthèse des Streptogramines sont organisés en clusters, et 3) les systèmes enzymatiques

responsables de cette biosynthèse n'ont pas une spécificité absolue pour leurs substrats.

Par ailleurs, le clonage de gènes impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines peut aussi se faire en utilisant des oligonucléotides dégénérés, préparés à partir des séquences des gènes sna ou snb cités plus haut, ou des fragments de ces gènes, ou des fragments contigus à ces gènes. Il est ainsi possible d'aller piocher les gènes de biosynthèse des composants A et B des différentes souches productrices de Streptogramines. Ces souches peuvent faire partie du genre Streptomyces, mais aussi d'autres genres (Cf tableau 1). En outre, si l'ADN génomique des souches de départ utilisées a une composition en G+C différente de celle observée chez les Streptomyces les sondes utilisées peuvent être synthétisées avec un biais de codon spécifique du genre ou de l'espèce à partir duquel on veut isoler l'ADN.

Un autre objet de la présente invention concerne les polypeptides résultant de l'expression des séquences nucléotidiques définies ci-dessus. Plus particulièrement, la présente invention concerne les polypeptides comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 2), SnaB (SEQ ID n° 3), SnaC (SEQ ID n° 7), SnaD (SEQ ID n° 8), PapA (SEQ ID n° 9), PapM (SEQ ID n° 10), SamS (SEQ ID n° 4), SnbA (SEQ ID n° 5), SnbC (SEQ ID n° 11 et 12), SnbD (SEQ ID n° 13 et 14), SnbE (SEQ ID n° 15 et 16) et SnbR (SEQ ID n° 6) ou de dérivés de ceux-ci. Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) substrat(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires et notamment de souches productrices de Streptogramines.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique ou un vecteur tel que défini ci-avant. Les cellules recombinantes selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, les oeufs de Xénope, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement Micromonospora, Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp.

10 Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes Actinomycètes, et notamment Streptomyces, E.coli (exemple 11), Bacillus. Préférentiellement, les cellules recombinantes de l'invention sont choisies parmi les cellules productrices de Streptogramines (Cf tableau 1). Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire une

15 séquence nucléotidique étrangère dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

L'invention a encore pour objet un procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines selon lequel on cultive une cellule recombinante telle que définie ci-avant et on récupère le polypeptide produit.

20

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une cellule recombinante telle que définie ci-avant exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion. En particulier, ces cellules peuvent permettre de transformer une Streptogramine en une forme dérivée. Par exemple, la Pristinamycine IIB peut être, de cette manière, transformée en Pristinamycine IIA. Le même raisonnement peut être appliqué à tout intermédiaire de biosynthèse. Ces cellules peuvent également permettre de fabriquer des antibiotiques hybrides ayant des propriétés pharmacologiquement intéressantes (Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989). Ces

25

30 bioconversions peuvent se faire soit à l'aide de cellules entières, soit à l'aide d'extraits acellulaires desdites cellules.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant pour amplifier la production de Streptogramine. L'invention concerne également un procédé de production de Streptogramines selon lequel on introduit et/ou on amplifie dans une cellule

35

productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention, on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et on récupère les Streptogramines produites.

5 La surexpression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse peut permettre l'augmentation de la production des Streptogramines A et/ou B des souches productrices. Cette surproduction peut se faire dans plusieurs souches : soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des Streptogramines A, soit des souches qui ne produisent que des molécules de la famille des
10 Streptogramines B, soit des souches qui produisent les deux composants A et B. Ces surexpressions peuvent résulter de l'augmentation du taux de synthèse, donc de la productivité, des composants A et/ou B soit en erlenmeyer, soit en petits fermenteurs, soit en gros fermenteurs industriels. Par ailleurs, la surexpression spécifique d'un gène impliqué dans la biosynthèse d'un composant A ou B permet
15 également de faire varier le % de composants A et B produits par la souche, et ainsi d'obtenir une meilleure synergie entre ces molécules. En outre, les gènes de biosynthèse isolés à partir d'un microorganisme producteur de Streptogramines peuvent être utilisés pour amplifier la production dans un autre microorganisme producteur.

20 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon lequel on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramines, une mutagénèse au niveau d'un gène au moins de la voie de biosynthèse.

Préférentiellement, la mutagénèse est effectuée in vitro ou in situ, par
25 suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

Un autre aspect de la présente invention réside en effet dans la construction de mutants bloqués dans certaines étapes de biosynthèse des Streptogramines. L'intérêt réside d'une part dans l'étude de la fonctionnalité des protéines mutées et d'autre part
30 dans la réalisation de souches produisant des intermédiaires de biosynthèse. Ces intermédiaires peuvent être modifiés, éventuellement après séparation, soit par ajout de composants particuliers dans les milieux de production, soit par introduction dans les souches ainsi mutées d'autres gènes susceptibles de modifier l'intermédiaire en s'en servant de substrat. Ces intermédiaires peuvent ainsi être modifiés par voie
35 chimique, biochimique, enzymatique et/ou microbiologique. Dans ce cadre, le

mutant SP92::pVRC505 de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 a été construit : *S. pristinaespiralis* SP92::pVRC505 a été isolée par intégration homologue dans le gène *snaA* d'un plasmide suicide pVRC505, construit à partir du vecteur pDH5 et d'un fragment interne au gène *snaA*. Les mutants suivants ont également été construits :
5 SP92 *samS::ΩamR*; SP92::pVRC508; SP92::pVRC404 et SP92::pVRC1000 (exemple 9).

L'invention concerne donc également un procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines selon lequel :

- on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse
10 des Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines selon lequel :

- 15 - on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines telle que décrite ci-avant,
- on cultive ladite cellule, et,
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

20 La présente invention est illustrée à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES.

- Figure 1 : Exemple de structure des composants A des Streptogramines.
- Figure 2 : Exemple de structure des composants B des Streptogramines.
- 25 Figure 3 : Autres exemples de structures de Streptogramines.
- Figure 4 : Représentation du cosmide pIBV1.
- Figure 5 : Représentation du cosmide pIBV2.
- Figure 6 : Représentation du cosmide pIBV3.
- Figure 7 : Représentation du cosmide pIBV4.
- 30 Figure 8 : Réaction catalysée par la Pristinamycine IIA synthase.
- Figure 9 : Réaction catalysée par l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.
- Figure 10 : Réaction catalysée par SnbC.
- Figure 11 : Réaction catalysée par SnbD.

- Figure 12 : Réaction catalysée par SnbE.
Figure 13 : Réaction catalysée par SnaC.
Figure 14 : Réaction catalysée par PapM.
Figure 15 : Représentation des plasmides pVRC402 (A) et pVRC501 (B).
5 Figure 16 : Représentation du plasmide pXL2045.
Figure 17 : Représentation du plasmide pVRC1105.
Figure 18 : Représentation du plasmide pVRC1106.
Figure 19 : Représentation du plasmide pVRC1104.
Figure 20 : Représentation du plasmide pVRC900.
10 Figure 21 : Représentation du plasmide pVRC1000.
Figure 22 : Représentation du plasmide pVRC509.
Figure 23 : Représentation du plasmide pVRC903.
Figure 24 : Représentation du plasmide pVRC409.
Figure 25 : Représentation du plasmide pVRC505.
15 Figure 26 : Représentation du plasmide pVRC701.
Figure 27 : Représentation du plasmide pVRC702.
Figure 28 : Représentation du plasmide pVRC508.
Figure 29 : Représentation du plasmide pVRC404.
Figure 30 : Représentation du plasmide pVRC507.
20 Figure 31 : Représentation du plasmide pVRC706.
Figure 32 : Cartographie générale.

MATERIELS.

- Colonne Bio-Sil SEC 125 et 250 (Bio-Rad)
Colonne MonoQ HR 5/5, 10/10 et 16/10 (Pharmacia)
25 Colonne PD-10 (Pharmacia)
Colonne Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia)
Colonne Superdex 200 Hi-Load 16/60 et 75 HR 10/30 (Pharmacia)
Colonne Superose 12 prep grade (Pharmacia)
Colonne Vydac C4 et C18 (The Separations Group)
30 Colonne Nucleosil 5-C18 (Macherey-Nagel)
Colonne Phenyl Superose HR 10/10 (Pharmacia)
Colonne TSK G2000 SW (Tosoh, Japon)
Phenyl Sepharose (Pharmacia)
FMN agarose (Sigma)

- Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)
- Sephadex G25 Fine (Pharmacia)
- Centricon 10 ou 30 (Amicon)
- Centriprep 10 ou 30 (Amicon)
- 5 Centrilutor (Amicon)

EXEMPLE 1 : Isolement de l'ADN total de la souche Streptomyces pristinaespiralis SP92.

Cet exemple illustre comment l'ADN de S. pristinaespiralis SP92 peut être purifié.

- 10 La souche S. pristinaespiralis SP92 dérive de la souche S. pristinaespiralis DS5647 (ATCC25486).

50 ml de milieu YEME (34 % de sucrose, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25 % (D. Hopwood *et al.*, 1985)) sont inoculés avec 10⁸ spores de S. pristinaespiralis SP92 et la culture est incubée 40 heures à 30°C, sous agitation de 280 tours/mn.

- 15 Le mycélium est récolté et lavé avec 15 ml de saccharose 10.3 %. Environ 1 g du culot de mycélium est repris par 5 ml de TE complété par 34 % de sucrose, auxquels sont ajoutés, 1 ml de lysozyme à 50 mg/ml dans une solution de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 et 1 ml d'EDTA 0.25 M pH 8,0. Après incubation à 30°C pendant une durée de 30 à 60 min, le mélange est éclairci par ajout de 0.8 ml de sarkosyl
- 20 10 %. Puis sont ajoutés, 2 ml d'EDTA 0.25 M pH 8,0, 10 ml de TE, 18 g de CsCl et 1.2 ml de BET à 10 mg/ml. La préparation est ultracentrifugée pendant une nuit à 55 000 tours/min, à 20°C.

- 25 L'ADN chromosomique présent dans le gradient de CsCl sous forme d'une bande, est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. Le BET est éliminé par plusieurs lavages avec une solution d'isopropanol saturée par du tampon TE, 5 M NaCl. L'ADN est précipité par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après lavage à l'éthanol 70 %, l'ADN est repris dans un volume approprié de TE. La quantité d'ADN total obtenu varie entre 250 et 500 µg par g de mycélium.

EXEMPLE 2 : Isolement d'ADN plasmidique d'E. coli :

- 30 Cet exemple illustre comment l'ADN plasmidique d'E. coli est préparé à partir des souches d'E. coli recombinantes.

2.1. Préparation d'ADN plasmidique d'E.coli en grosses quantités.

Cet exemple illustre comment les maxipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez E. coli.

5 Cette préparation est effectuée à partir d'une culture de 500 ml en milieu LB contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le protocole d'extraction est dérivé des méthodes décrites par Birnboim et Doly (1979) et Ish-Horowicz et Burke (1981) et est décrit dans Maniatis et al. (1989).

10 Après cette extraction, l'ADN plasmidique est purifié par gradient de CsCl, comme décrit dans Maniatis et al. (1989). L'ADN plasmidique est ensuite précipité par ajout de 3 volumes de TE et 4 volumes d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est repris dans 0.5 à 1 ml de TE.

2.2. Préparation d'ADN plasmidique d'E. coli, en petites quantités.

Cet exemple illustre comment les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées chez E.coli.

15 Cette préparation est réalisée à partir de 1.5 ml de culture en milieu LB contenant 150 µg/ml d'ampicilline. La procédure est celle décrite par Birnboim et Doly (1979).

EXEMPLE 3 : Construction de la banque d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92 chez E. coli et préparation des membranes d'hybridation.

20 Cet exemple illustre comment une banque d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 est réalisée chez E.coli.

3.1. Préparation des fragments d'ADN génomique.

Cet exemple illustre comment des fragments d'ADN génomique de haut poids moléculaire peuvent être préparés.

25 L'ADN total de la souche SP92, préparé comme décrit dans l'exemple 1, est digéré partiellement par Sau3A (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) dans le tampon préconisé par le fournisseur : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA. La quantité d'enzyme utilisée pour obtenir des fragments d'ADN de haut poids moléculaire, a été déterminée empiriquement.
30 Environ 0.025 unités d'enzyme sont utilisées pour digérer 1 µg d'ADN total pendant 20 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 15 min à 65°C et l'enzyme éliminée par l'addition d'un volume égal de phénol-chloroforme. Après

centrifugation, le surnageant contenant l'ADN total partiellement digéré est précipité par ajout d'acétate de sodium 0.3 M final et 2.5 volumes d'éthanol.

Environ 100 µg d'ADN total sont ainsi digérés, puis les fragments d'ADN de taille comprise entre 30 et 50 kb sont isolés par gradient de sucrose 10-40 %. Leur
5 taille est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,4 %.

3.2. Préparation du cosmide pH79.

Cet exemple illustre comment le cosmide pH79 est préparé à partir d'*E. coli*.

Le cosmide pH79 (Hohn, B. and Collins, 1980) comprend une partie de pBR322 (Bolivar, F. et al., 1977), la région *cro-cII* de λ et la région contenant la
10 séquence *cos* de Charon 4A (Blattner, F.R. et al., 1977).

L'extraction du cosmide a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1., à partir d'une souche d'*E. coli* TG1 (K12, $\Delta(\text{lac-pro})$ *supE thi hsd DS F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q LacZ Δ M15*, Gibson, 1984).

500 ng de cosmide pH79 ont été digérés par *Bam*HI (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) dans 20 µl de tampon 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoéthanol, 100 µg/ml BSA.
15

3.3. Ligation des fragments d'ADN et du cosmide.

Cet exemple illustre comment les fragments du génome de *S. pristinaeae* SP92, issus d'une digestion *Sau*3A, peuvent être ligués avec le vecteur pH79
20 linéarisé par *Bam*HI.

Environ 150 ng de cosmide linéarisés comme décrit plus haut ont été précipités à l'éthanol avec 350 ng de fragments d'ADN total de *S. pristinaeae* SP92 préparés comme décrit à l'exemple 3.2. Le culot a été repris dans 10 µl de tampon de ligation : 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50
25 µg/ml de BSA et 0.5 µl de T4 DNA ligase à 400 000 unités par ml (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) ont été ajoutés. L'incubation a été réalisée durant une nuit à 15°C.

3.4. Réalisation de l'encapsulation in vitro.

Cet exemple illustre comment les cosmides construits en 3.3 sont encapsidés *in vitro*.
30

L'encapsulation des cosmides hybrides après ligation a été réalisée à partir du kit Gigapack II Gold, développé par Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA).

2 x 4 µl de mélange de ligation, soit 2 x 70 ng de cosmides hybrides ont été encapsidés in vitro selon la procédure décrite par le fournisseur.

3.5. Transfection des souches d'E.coli DH1 et HB101.

Cet exemple illustre comment les cosmides sont introduits chez E.coli.

- 5 Deux transfusions en parallèle ont été réalisées avec les souches d' E.coli DH1 (F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44L⁻, Low 1968) et HB101 (F⁻ supE44 hsdS20(rB⁻mB⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1, Boyer et Roulland-Dussoix 1969).

- 10 Les cellules ont été préparées selon le protocole suivant : une préculture de 100 ml est réalisée en milieu LB complémenté par 0.2 % Maltose et 10 mM MgSO₄, pendant 4 à 5 heures jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne la valeur de 0.8. La culture est alors centrifugée et le culot repris dans 40 ml de MgSO₄ 10 mM et dilué jusqu'à DO₆₀₀=0,5, dans la même solution. 200 µl de la suspension cellulaire ainsi préparée sont mélangés à 100 µl de mélange d'encapsulation. Après 20 mn de contact à 37°C, 15 1 ml de LB est ajouté et l'ensemble est incubé 1 heure à 37°C. Les transfectants sont ensuite sélectionnés sur milieu LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Le nombre de transfectants obtenus est d'environ 10⁴ par µg de cosmide recombinant.

3.6. Stockage des banques d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92.

- 20 Cet exemple illustre comment les banques d'ADN génomique de S.pristinaespiralis SP92 sont conservées.

- Après vérification de la taille moyenne des fragments insérés dans le cosmide pH79, environ 1500 colonies issues de chacune des transfusions réalisées avec les souches HB101 et DH1 sont repiquées dans des plaques de micro-titration à 96 puits contenant 200 µl de milieu Hogness (milieu LB complémenté avec 8.8 % glycérol, 3 mM sodium acétate, 55 mM K₂HPO₄, 26 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, ampicilline 150 µg/ml). Ces plaques sont incubées une nuit à 37°C puis stockées à -80°C.

3.7. Préparation des membranes d'hybridation à partir des banques génomiques de S. pristinaespiralis SP92.

- 30 Cet exemple illustre comment l'ADN des colonies constituant les banques génomiques de S. pristinaespiralis SP92 est transféré sur une membrane d'hybridation.

Ces membranes d'hybridation ont été réalisées en double pour chacune des 2 banques, selon le protocole suivant :

Les 15 plaques de micro-titration de chaque banque sont répliquées à l'aide d'une brosse à clous sur milieu LB agar contenant 150 µg/ml d'ampicilline. Après une nuit de croissance à 37°C, le transfert des colonies est effectué sur membrane Biohylon Z⁺ (Bioprope System) selon le protocole suivant : la membrane découpée à la taille adéquate est laissée au contact des colonies pendant 1 min. Puis une dénaturation est effectuée par imbibation de la membrane avec une solution de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M pendant 5 min, suivie d'une neutralisation par imbibation de la membrane dans une solution d'acétate de sodium 3 M pendant 5 min. L'ADN est fixé sur la membrane par exposition sous une lampe UV pendant 5 min.

EXEMPLE 4

4.1. Préparation de l'ADN chromosomique de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 et de souches dérivées de SP92 sous forme d'inserts pour l'électrophorèse à champ pulsé.

Cet exemple illustre comment l'ADN de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 et des souches dérivées de SP92 est préparé sous forme d'inserts pour l'électrophorèse à champ pulsé.

Cette préparation est effectuée à partir d'une culture de mycélium obtenue de la façon suivante: 30 ml de milieu YEME contenant 0.25 % de glycine sont inoculés avec 10⁸ spores de la souche étudiée, la culture est incubée pendant 48 heures à 30°C et agitée à 280 rpm dans des erlens de 250 ml. Le mycélium est ensuite récolté par centrifugation de 10 min à 3800 rpm et lavé deux fois avec du saccharose 10 %. Le culot de mycélium est ensuite remis en suspension dans 5ml de solution I (EDTA 250 mM pH 8,0, saccharose 20.6 %). A 200 µl de mycélium ainsi obtenu, on ajoute 400 µl d'une solution de lysozyme à 50 mg/ml dans la solution I ainsi que 800 µl d'agarose LMP à 1 % dans 25 mM EDTA pH 8 et 10.3 % saccharose, maintenu à 42°C. Le mélange maintenu à 42°C est ensuite coulé dans les puits de peignes spéciaux que l'on ferme avec du ruban adhésif et que l'on garde 30 min à 4°C. Le mélange se solidifie et les 30 à 40 inserts ainsi obtenus et contenus dans les puits sont démoulés avec précaution.

Les inserts sont d'abord rincés pendant 30 min à 4°C dans une solution contenant 25 mM EDTA et 10.3 % saccharose. On les fait ensuite tremper dans une solution d'EDTA 500 mM, 1 % de Lauryl sarcosyl et 1 mg/ml de protéinase K pendant deux fois 24 heures à 50°C en agitant de temps en temps. Puis les inserts

sont lavés 3 fois une heure dans du TE contenant 1mM PMSF en changeant la solution après chaque lavage. Les inserts ainsi obtenus sont conservés à 4°C pendant 4 mois maximum dans de l'EDTA 0.5 M pH 8,0.

5 4.2. Digestion d'inserts de l'ADN de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 et de souches dérivées de SP92 et analyse par électrophorèse à champ pulsé.

Cet exemple illustre comment l'ADN chromosomique de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 et de souches dérivées de SP92 préparé sous forme d'inserts comme il est décrit dans l'exemple 4.1., est coupé par différentes enzymes de restriction pour l'électrophorèse à champ pulsé.

10 4.2.1. Digestion de l'ADN chromosomique en inserts:

Les inserts sont d'abord lavés six fois dans du TE puis incubés deux fois pendant une heure dans le tampon de l'enzyme de restriction choisie. Chaque insert est ensuite déposé dans le couvercle d'un tube eppendorf contenant 160 µl de tampon de l'enzyme de restriction et 40 unités d'enzyme. L'ensemble est recouvert d'un parafilm et l'eppendorf est fermé pour maintenir le parafilm qui permet d'éviter toute évaporation du tampon. Les tubes sont incubés à la température voulue dans une étuve pendant une nuit.

4.2.2. Analyse de l'ADN digéré par électrophorèse à champ pulsé:

20 La technique d'électrophorèse à champ pulsé choisie pour cette étude est celle du système CHEF (Clamped Homogenous Electric Field) mis au point par Chu *et al* (1986) qui permet d'obtenir deux champs alternatifs homogènes orientés de 120° l'un par rapport à l'autre et des trajectoires rectilignes pour les molécules d'ADN. L'appareillage utilisé est le "Pulsafor System" commercialisé par Pharmacia-LKB.

On a fait varier les paramètres de migration électrophorétique tels que le temps de pulse (i.e. la durée d'application du champ électrique) et la durée de migration de manière à obtenir une séparation optimale de fragments d'ADN dont la taille s'échelonne entre 10 et 2500 kb. Les trois conditions de migration utilisées sont les suivantes: pour séparer des grands fragments d'une taille de 200 à 1700 kb, la migration choisie est de 40 heures avec un temps de pulse de 90 secondes; pour 25 séparer des fragments d'une taille de 50 à 400 kb, la migration choisie est de 20 heures avec un temps de pulse de 10 secondes puis 20 heures avec un temps de pulse de 30 secondes; enfin, pour séparer des plus petits fragments d'une taille de 10 kb à 200 kb, la migration choisie est de 24 heures avec un temps de pulse de 10 secondes.

Pour ces trois conditions de migration, le voltage est fixé à 150 Volts constants, la température est maintenue à 13°C et les gels électrophorétiques contiennent 1.3 % d'agarose.

Les inserts contenant l'ADN chromosomique de la souche *S. pristinaespiralis* SP92 et des souches dérivées de SP92 sont digérés par les enzymes de restriction comme il est décrit ci-dessus, et sont déposés dans les puits du gel électrophorétique à l'aide de deux lames de scalpel. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont le "Yeast chromosome PFG marker" et le "Lambda ladder PFG marker" commercialisés par la société New England Biolabs. La migration s'effectue dans une des conditions décrites précédemment et le gel est ensuite coloré dans un bain de BET (bromure d'éthidium) à 4 µg/ml pendant 20 min puis décoloré dans de l'eau pendant 20 min. Après photographie du gel, les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec des sondes marquées au [α -³²P]dCTP comme il est décrit dans l'exemple 9.1.

EXEMPLE 5 : Isolement de cosmides portant les gènes codant pour des protéines purifiées impliquées dans la biosynthèse des Streptogramines.

Cet exemple décrit comment, à partir d'une protéine purifiée intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines, dont la séquence NH₂-terminale, ou une séquence interne ont été établies, il est possible d'isoler à partir des banques génomiques précédemment réalisées, un cosmide portant le gène de structure de cette même protéine ou bien d'identifier parmi les gènes déjà séquencés portés par les cosmides le gène de structure correspondant.

5.1. Isolement des cosmides pIBV1 et pIBV3 portant l'un ou les deux gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase.

5.1.1. Identification et purification d'une des protéines impliquées dans l'étape finale de la synthèse des Pristinamycines II : la Pristinamycine IIA synthase.

Comme il a été indiqué dans l'introduction, la dernière étape de synthèse de la Pristinamycine IIA correspond à une oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline en déhydroproline. La protéine responsable de cette activité a été purifiée jusqu'à homogénéité comme l'illustre cet exemple.

5.1.1.A. Dosage de l'activité Pristinamycine IIA synthase.

Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de la Pristinamycine IIA synthase qui catalyse la conversion de la Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA par oxydation du résidu D-proline de la Pristinamycine IIB en résidu 2-3 déhydroproline (figure 8) en présence d'oxygène moléculaire et de FMNH₂. Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0,005 unités) sont incubées 1 heure à 27°C dans un volume total de 500 µl de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant NADH (500 µM), FMN (5 µM), Pristinamycine IIB (20 µM) et 0,02 unités de FMN réductase (Boehringer Mannheim).

La Pristinamycine IIA formée est dosée par CLHP après l'arrêt de l'incubation par ajout de 500 µl d'acide chlorhydrique 0,1 N et 500 µl d'acétonitrile, et une centrifugation de l'échantillon pendant 5 min à 5000 g. 150 µl du surnageant de centrifugation sont injectés sur une colonne Nucléosil 5-C8 de 15 cm éluée par un mélange de 34 % d'acétonitrile et 66 % tampon phosphate 0,1 M pH 2,9. Les Pristinamycines IIA et IIB sont détectées grâce à leur absorbance UV à 206 nm.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour synthétiser 1 µmole de Pristinamycine IIA par heure dans les conditions décrites.

5.1.1.B. Purification de la Pristinamycine IIA synthase de *S. pristinaespiralis* SP92.

Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.1.1.A la purification de la Pristinamycine IIA synthase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler et conserver les fractions actives à -30°C entre chaque étape si nécessaire.

150 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinaespiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 450 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant 5 mM de DTT et 0,2 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 45 minutes à 27°C puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction protéique précipitant entre 40 et 55 % de

saturation est déssalée sur une colonne de Sephadex G25 Fine puis injectée (100 mg par injection) dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM sur une colonne MonoQ HR 10/10. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.1.1.A) sont regroupées et concentrées à 20 ml sur Centriprep 10. Après dilution par un volume de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM contenant 2 M de sulfate d'ammonium, les protéines sont chromatographiées (22,5 mg par injection) sur une colonne Phenyl Superose HR 10/10 avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,0 M à 0 M). Les meilleures fractions contenant l'activité recherchée sont rassemblées, reconcentrées à 1 ml sur Centriprep 10, puis appliquées (200 µl par injection) sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 77 000. La fraction contenant l'activité est injectée sur une colonne MonoQ HR 5/5 dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM éluee avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5 M).

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS, deux sous unités de poids moléculaire estimé à 35 000 et 50 000 sont mises en évidence. Elles sont séparées sur colonne Vydac C4 de 25 cm éluee avec un gradient linéaire de 30 à 50 % d'acétonitrile dans l'eau à 0,07 % d'acide trifluoroacétique.

20

Tableau: Purification de la Pristinamycine IIA synthase

Etape de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé. µmole/h/mg	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	490	1690	0,14	100	1
40-55% S. A.	60	1050	0,19	85	1,4
MonoQ 10/10	95	45	3,0	58	21
Phényl-Superose	8	2,8	12	14	86
BioSil SEC	5	1,3	18	14	130
MonoQ 5/5	10	0,7	23	10	160

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.1.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir des séquences protéiques :

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminales des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase purifiée comme décrit dans l'exemple 5.1.1.B., il est possible de synthétiser des oligonucléotides. Les deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase sont appelées SnaA et SnaB et correspondent aux polypeptides de poids moléculaire de 50000 et 35000 respectivement tel que cela est décrit à l'exemple 5.1.1.B.

Les séquences NH₂-terminales des protéines SnaA et SnaB, correspondant aux sous unités de la Pristinamycine IIA synthase, ont été réalisées par micro-séquençage. Ceci est fait par la technique de dégradation d'Edman, en utilisant un séquenceur automatisé (Applied Biosystems modèle 407A) couplé à un appareil CLHP pour l'identification des dérivés phénylthiohydantoïnes. Une trentaine de résidus ont été déterminés pour chacune d'entre elles.

Protéine SnaA : (Cf résidus 2 à 29 sur SEQ ID n° 2)

15 T A P(R)(R,W)R I T L A G I I D G P G G H V A A(W)R H P (A) T

Protéine SnaB : (Cf résidus 2 à 31 sur SEQ ID n° 3)

T A P I L V A T L D T R G P A A T L G T I T(R)A V(R)A A E A

Par ailleurs des séquences internes à ces deux polypeptides ont été déterminées après digestions tryptiques de SnaA et SnaB et purification des fragments obtenus sur colonne CLHP Vydac C18. Les séquences internes suivantes ont été trouvées:

Protéine SnaA : (Cf résidus 365 à 384 sur SEQ ID n° 2)

G A D G F N I D E P Y L P G S A D D F V

Protéine SnaB : (Cf résidus 122 à 136 sur SEQ ID n° 3)

G L(-)D S F D D D A F V H D R

25 A partir des régions soulignées dans chacune des séquences des fragments internes aux protéines SnaA et SnaB et, en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés par un synthétiseur automatisé Biosearch 8600. Ils ont ensuite été purifiés par la technique déjà décrite (Sawadogo M. et Von Dyke M. W., 1991). Les gènes snaA et snaB désignent les gènes de structure des protéines SnaA et SnaB respectivement.

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaA :

ATC GAC TTC CCC TAC CTC CCC GG
 T T G T G G

5

A
 T

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de SnaB :

TTC GAC GAT GAT GCA TTC GTC CAT GAC
 C C T G C

10

C
 G

5.1.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation avec les banques d'ADN génomique de la souche SP92.

Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de *S. pristinaespiralis* SP92 a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ - ^{32}P]phosphate de l'ATP par la T4 polynucléotide kinase. Ce marquage est réalisé comme indiqué dans Maniatis et al. (1989). Après le marquage, les oligonucléotides sont utilisés sans purification.

Environ 2 X 500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au ^{32}P et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque est réalisée selon un protocole dérivé de ceux développés par Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984) et Hames, B.D. and Higgins, S.J. (1985) : les 15 membranes sont préhybridées pendant 3 heures à 50°C dans 40 ml d'une solution contenant : Denhardt (X5) [Denhardt (X100) : 2 % (p/v) Ficoll, 2 % (p/v) polyvinyl-pyrrolidone, 2 % (p/v) BSA], SSC (X5) [SSC (X20) : NaCl 3 M, citrate de sodium 0.3 M), NaPO_4 pH 6,5 50 mM, SDS 0.1 %, ADN de sperme de saumon 250 $\mu\text{g/ml}$].

L'hybridation est ensuite réalisée pendant une nuit à 50°C, dans 20 ml de la même solution auxquels sont ajoutés les 500 ng d'oligonucléotides marqués.

Les filtres sont ensuite lavés dans une solution de SSC (X 6) et SDS 0.5 %, 2 fois 30 min à température ambiante puis de façon empirique à des températures graduellement plus élevées (50 à 65°C). La température de ces derniers lavages est progressivement augmentée après des expositions autoradiographiques successives afin de déterminer la spécificité des clones hybridants avec les mélanges d'oligonucléotides.

5.1.4. Isolement des cosmides pIBV1 et pIBV3 et détermination des régions contenant les gènes snaA et snaB.

Cet exemple illustre comment il est possible d'isoler des cosmides construits comme il est décrit dans l'exemple 3, contenant des gènes de biosynthèse des
5 Pristinamycines.

Les cosmides pIBV1 et pIBV3 ont été isolés de deux clones provenant respectivement de la banque réalisée dans la souche HB101 et de la banque réalisée dans la souche DH1, ayant hybridé avec les deux mélanges d'oligonucléotides simultanément pour pIBV1 et avec le mélange d'oligonucléotides issus de la
10 séquence interne de la protéine SnaA pour pIBV3.

Ces cosmides ont été purifiés comme décrit dans l'exemple 2. Les cosmides pIBV1 et pIBV3 contiennent respectivement un insert d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92 dont les tailles ont été estimées respectivement à 30 kb et 34 kb. Une cartographie (figure 4 et 6) a été établie à partir de digestions avec
15 différentes enzymes de restriction, selon les protocoles du fournisseur (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA).

Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV1 et pIBV3 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région de ce cosmide contenant les gènes snaA et/ou snaB.

20 Les Southern ont été réalisés comme décrit dans Maniatis et al. (1989). Après séparation des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 %, l'ADN est transféré sur membrane Biohylon Z⁺ (Bioprobe System). L'hybridation de l'ADN ainsi transféré sur les membranes avec les mélanges d'oligonucléotides a été réalisée comme décrit dans l'exemple 5.1.3.

25 Ces Southern ont permis de montrer que le cosmide pIBV1 possédait un fragment BamHI de 6 kb contenant les séquences homologues aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.1.2 (issues des protéines SnaA et SnaB) ainsi qu'un fragment EcoRI de 2,5 kb interne au fragment BamHI contenant les séquences homologues aux sondes issues exclusivement de la protéine SnaA. De plus les
30 signaux d'hybridation obtenus avec le cosmide pIBV3 ont montré qu'il ne possédait que le fragment EcoRI de 2,5 kb contenant les séquences homologues aux sondes issues exclusivement de la protéine SnaA.

5.2. Isolement du cosmide pIBV2 contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (snbA).

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins un gène de biosynthèse des
5 Pristinamycines I.

5.2.1. Identification et purification de la protéine impliquée dans l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique.

Cet exemple illustre comment la protéine responsable de l'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique peut-être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de
10 *S. pristinaespiralis* SP92.

5.2.1.A. Dosage de l'activité acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des
15 Pristinamycines. Il s'agit de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase qui catalyse la formation de l'adenylate de l'acide 3-hydroxypicolinique (figure 9) à partir de cet acide libre et de l'ATP en présence de $MgCl_2$.

Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0.020 unités) sont incubées pendant 15 min à 27°C dans un volume total de 250 µl de tampon pH 6,8
20 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, en présence d'acide 3-hydroxypicolinique (1mM), ATP (2mM), $MgCl_2$ (5mM) et tetrasodium pyrophosphate marqué avec l'isotope 32 radioactif de l'atome de phosphore (200 µM).

La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml d'une suspension de charbon activé à
25 10 g/l dans un mélange de 75 % de tetrasodium pyrophosphate 0,1 M et 25 % d'acide perchlorique à 14 %. Après agitation le charbon est recueilli et lavé par deux fois 1 ml du mélange pyrophosphate-acide perchlorique. Les molécules organiques radioactives sont alors éluées par trois fois 1 ml d'un mélange de 50 % de méthanol et 50 % d'ammoniaque N, dans une fiole de comptage contenant 12 ml d'eau. La
30 radioactivité est mesurée par effet Cerenkov avec un compteur à scintillation (Minaxi TriCarb 4000 PACKARD).

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour incorporer 1 µmole de pyrophosphate dans l'ATP en 1 heure dans les conditions décrites ci-dessus.

5.2.1.B. Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de *S. pristinaespiralis* SP92.

Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

- 5 En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.2.1.A, la purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler à -70°C les fractions actives et de les conserver à -30°C entre chaque étape si nécessaire.

- 234 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2
10 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinaespiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 234 ml de tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM contenant 4 mM DTE, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol et 0,6 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 30 minutes à 27°C puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut
15 ainsi recueilli est injecté dans le tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol sur une colonne (80 ml) de Q-Sepharose Fast Flow. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,4 M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.2.1.A) sont regroupées et diluées par un volume de
20 tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol contenant 2 M de sulfate d'ammonium. Les protéines sont alors chromatographiées sur une colonne (50 ml) de Phényl-Sepharose avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (1,0 M à 0 M) dans le tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol. Après ajout de 4 mM
25 DTE, les fractions actives sont rassemblées, reconcentrées à 5 ml sur Centriprep 10, puis appliquées sur une colonne (100 ml) de Superose 12 prep grade. Les fractions contenant l'activité recherchée sont regroupées et injectées dans le tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol (environ 6 mg par injection) sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluee avec un
30 gradient linéaire de KCl (0 à 0,4 M). Les fractions actives sont regroupées, concentrées à 1 ml sur Centricon 10, diluées par 3 volumes de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 15 % v/v glycérol, puis injectées (2 mg par injection) dans ce dernier tampon sur une colonne de MonoQ HR 5/5 éluee avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,3 M). Les
35 meilleures fractions contenant la ligase recherchée sont regroupées, puis appliquées

dans un tampon pH 6,8 phosphate de sodium 20 mM, sulfate de sodium 50 mM sur une colonne Bio-Sil SEC 250. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 60 000.

La protéine possédant l'activité d'activation de l'acide 3-hydroxypicolinique est désignée par la suite SnbA.

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS son poids moléculaire est estimé à environ 67 000.

Tableau: Purification de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase

Etape de Purification	vol. (ml)	Protéine s (mg)	Act. Spé. $\mu\text{mole/h/mg}^a$	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	246	2050	(0,06)		
Q-Sepharose	40	188	0,47	100	1
Phényl-Sepharose	70	35	2,21	88	4,7
Superose 12	16	17	2,03	39	4,3
MonoQ pH 8,0	4,5	9,0	2,09	21	4,5
MonoQ pH 6,8	1,0	2,0	2,9	6,6	6,2
Bio-Sil 250	2,5	0,23	12,4	3,2	26

^a L'activité dans l'extrait brut ne peut pas être mesurée précisément à cause d'échanges entre le pyrophosphate et l'ATP non spécifiques de l'acide 3-hydroxypicolinique.

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.2.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique:

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminale et interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de synthétiser des oligonucléotides.

La séquence NH₂-terminale de la protéine SnbA a été réalisée par micro-séquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. Une vingtaine de résidus ont été ainsi identifiés.

Une séquence interne à la protéine SnbA, d'environ 20 acides aminés, a également été identifiée, après hydrolyse trypsique et purification des fragments obtenus sur colonne CLHP Vydac C18.

Séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

5 (Cf résidus 1 à 21 sur SEQ ID n° 5)

MLDGSVPWPEDVAAKYRAAGY

Séquence interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase:

(Cf résidus 448 à 467 sur SEQ ID n° 5)

VSA (-)EVEGHLGAHPDVOQAA

10 A partir des régions soulignées dans chacune des séquences et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence NH₂-terminale de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

[illegible]

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de la protéine 3-hydroxypicolinique-AMP ligase :

20 5'
3'
GAG GTC GAG GGC CAC CTC GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG
GC
G G G G G G G

25 5.2.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation
des banques d'ADN génomique de *S. pristinaespiralis* SP92.

Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés

avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S. pristinaespiralis a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ -³²P]phosphate de l'ATP, par la T4 polynucléotide
5 kinase, comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

Environ 2 X 500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au ³²P et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque a été réalisée comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

10 5.2.4. Isolement du cosmide pIBV2 et détermination de la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3, contenant au moins le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

15 Le cosmide pIBV2 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche d'E. coli DH1, ayant hybridé avec les deux mélanges d'oligonucléotides simultanément.

Ce cosmide a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 47 kb.

20 Une cartographie (figure 5) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, comme indiqué dans l'exemple 5.1.4.

Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV2 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase. Les
25 Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV2 possédait un fragment EcoRI-BglII de 5,5 kb, contenant la séquence homologue aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.2.2.

30 5.3. Mise en évidence de la présence d'une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II (SnbC) sur le cosmide pIBV3.

Cet exemple illustre comment il est possible d'identifier la présence de gènes de biosynthèse des Pristinamycines I sur un cosmide déjà isolé (Exemple 5.1).

5.3.1. Identification de la Pristinamycine I synthase II impliquée dans l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA.

5 Cet exemple illustre comment la protéine responsable de l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA peut être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de *S. pristinaespiralis* SP92.

5.3.1.A. Dosage des activités partielles de la Pristinamycine I synthase II.

10 Cet exemple illustre le dosage d'activités de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'ont encore jamais été décrites et qui possèdent la propriété remarquable de n'être exprimées que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit des activités partielles de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA (figure 10) en présence d'ATP et de $MgCl_2$.

15 Les activités thréonine-AMP ligase et acide aminobutyrique-AMP ligase sont mesurées dans un test enzymatique d'échange ATP-pyrophosphate analogue à celui décrit en 5.2.1.A pour l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

20 Les réactions d'aminoacylation de l'enzyme avec la thréonine ou l'alanine (un analogue de l'acide aminobutyrique que l'on retrouve dans la Pristinamycine IC) permettent de différencier la peptide synthase d'autres enzymes qui peuvent effectuer un échange ATP-pyrophosphate et notamment les aminoacyl-tRNA synthases. C'est donc le test d'aminoacylation de l'enzyme avec la thréonine marquée au tritium décrit ci-dessous qui a été utilisé dans cet exemple.

25 Les fractions enzymatiques à doser (0,2 à 2 unités) sont incubées pendant 15 min à 27°C dans un volume total de 250 µl de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, en présence de 1 µCi de $[3-^3H]$ L-thréonine (15 Ci/mmol), d'ATP (2 mM) et de $MgCl_2$ (5 mM).

30 La réaction est arrêtée par ajout de 150 µl d'une solution d'acide trichloroacétique à 25 %. Les protéines précipitées sont recueillies sur un microfiltre et lavées par 3 fois 400 µl d'acide trichloroacétique à 7 % avant d'être éluées par 2 fois 400 µl de soude N dans une fiole de comptage contenant 1 ml HCl N et 12 ml de cocktail scintillant (Readygel Beckmann). La quantité de radioactivité contenue dans cette fiole est mesurée avec un compteur à scintillation (Minaxi TriCarb 4000 PACKARD). Elle représente la quantité de thréonine fixée de façon covalente à la
35 peptide synthase recherchée.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour fixer de manière covalente 1 picomole de thréonine en 15 min dans les conditions décrites ci-dessus.

5.3.1.B. Purification de la Pristinamycine I synthase II.

5 Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinae spiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.3.1.A. la purification de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA est réalisée
10 comme décrit ci-dessous en prenant soin de travailler à 4°C et de conserver à -70°C les fractions actives.

150 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinae spiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 450 ml de tampon pH 8,0
15 Tris-HCl 100 mM contenant 4 mM DTE, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 15 % v/v glycérol. La suspension ainsi obtenue est broyée à l'aide d'une French Press réglée à la pression de 5000 psi puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est injecté dans le tampon pH 8 tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 2 mM benzamidine, 2 mg/l leupeptine, 1mg/l E-64, 15 % v/v
20 glycérol sur une colonne (200 ml) de Q-Sepharose Fast Flow. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,6 M). A la sortie de la colonne chaque fraction est additionnée d'un dixième de son volume d'une solution de PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM. Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.3.1.A) sont regroupées et reconcentrées
25 par ultrafiltration sur Centriprep 30 jusqu'à un volume final de 28 ml. Ce concentrat est injecté par aliquote de 4 ml sur une colonne de perméation Superdex 200 Hi-Load 16/60 équilibrée dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, 1 mM benzamidine, 4 mM DTE, 0,2 mM Pefabloc, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 20 % v/v glycérol. Après dosage, les fractions actives sont rassemblées et reconcentrées à
30 15 ml sur Centriprep 30, puis dessalées sur PD-10 dans le tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 2 mM benzamidine, 2 mg/l leupeptine, 1mg/l E-64, 20 % v/v glycérol et appliquées en deux fois sur une colonne MonoQ HR 10/10 équilibrée et éluee avec un gradient linéaire de 0,4 M de KCl dans ce même tampon. Les fractions contenant l'activité recherchée sont regroupées, reconcentrées sur Centriprep 30
35 puis Centricon 30 jusqu'à un volume final de 1 ml et injectées en cinq fois sur une

colonne de Superose 6 HR 10/30 dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, 1 mM benzamidine, 4 mM DTE, 0,2 mM Pefabloc, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 20 % v/v glycérol. Le pic d'activité est détecté dans cette technique à un poids moléculaire centré à 450 000.

- 5 Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS son poids moléculaire est estimé à environ 240 000. Cette bande contient également toute la radioactivité de la protéine marquée par aminoacylation avec la thréonine tritiée.

- 10 A ce stade l'activité maximale de l'enzyme en utilisant une concentration de 100 μ Ci/ml de thréonine (15 Ci/mmmole) s'élève à 3670 unités/mg; l'enzyme est également capable de former des adénylates avec l'acide-L-aminobutyrique ou la L-alanine ; une réaction d'aminacylation de l'enzyme avec l'alanine tritiée est détectée et l'activité maximale en présence de 200 μ Ci/ml de [2,3- 3 H] L-alanine (15 Ci/mmmole) est de 2290 pmoles/mg en 15 min.

Tableau: Purification de la Pristinamycine I synthase II.

15

Etape de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé ^a (unités /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	445	4700	(1)	-	-
Q-Sepharose	308	834	7	100	1
Superdex 200	120	105	22	40	3,1
MonoQ HR	15	11,5	96	19	14
Superose 6	7,5	2,8	122	6	17

a: L'activité dans l'extrait brut ne peut pas être mesurée précisément.

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.3.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique.

- 20 Cet exemple décrit comment à partir de séquences internes de la Pristinamycine I synthase II il est possible de synthétiser des oligonucléotides.

Les séquences internes de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus thréonine et acide aminobutyrique dans la chaîne peptidique de la

Pristinamycine IA ont été réalisées par microséquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. après hydrolyse trypsique et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18.

Séquences internes à la protéine Pristinamycine I synthase II.

5 (Cf résidus 49 à 61 sur SEQ ID n° 12)

1 5 10

L AAFNDTARPVPR

1 5 10 15 20

VPAAFVPLDALPLTGNGVLD

10 A partir des régions soulignées dans ces séquences et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence 1 interne à la protéine Pristinamycine I synthase II:

15 5' 3'

GCC GCC TTC AAC GAC ACC GCC CGC CC

G G G G G

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence 2 interne à la protéine Pristinamycine I synthase II:

20 5' 3'

TTC GTC CCC CTC GAC GCC CTC CCC CT

G G G G G G

5.3.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation en Southern de l'ADN du cosmide pIBV3.

25 Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines I peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec une membrane sur laquelle l'ADN du cosmide pIBV3 a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ - ^{32}P]phosphate de l'ATP, par la T4 polynucléotide

30 kinase, comme indiqué dans 5.1.3.

Environ 500 ng du mélange d'oligonucléotides a été ainsi marqué au ^{32}P et a été utilisé pour hybrider en Southern de l'ADN de pIBV3 digéré par différentes

enzymes. Ces hybridations ont permis de montrer qu'une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II était porté par le cosmide pIBV3 et d'identifier la région contenant ce gène. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

- 5 Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV3 possédait un fragment SphI de 6,2 kb, contenant la séquence homologue aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.3.2.

5.4. Mise en évidence de la présence d'une partie du gène de structure de la Pristinamycine I Synthase III (SnbD) sur le cosmide pIBV3.

- 10 Cet exemple illustre comment il est possible d'identifier la présence de gènes de biosynthèse des Pristinamycines I sur un cosmide déjà isolé (Exemple 5.1).

5.4.1. Identification de la pristinamycine I synthase III impliquée dans l'incorporation des résidus proline et p-diméthylaminophenylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA.

- 15 Cet exemple illustre comment la protéine responsable de l'incorporation des résidus proline et p-diméthylaminophenylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA peut être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de S. pristinaespiralis SP92.

5.4.1.A. Dosage des activités partielles de la pristinamycine I synthase III.

- 20 Cet exemple illustre le dosage d'activités de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'ont encore jamais été décrites et qui possèdent la propriété remarquable de n'être exprimées que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit des activités partielles de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus proline et paradiméthylaminophenylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA (figure 11) en présence de SAM, d'ATP et de $MgCl_2$.

Les activités proline-AMP ligase et p-diméthylaminophenylalanine-AMP ligase sont mesurées dans un test enzymatique d'échange ATP-pyrophosphate analogue à celui décrit en 5.2.1.A. pour l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

- 30 Les réactions d'aminacylation de l'enzyme avec la proline et la p-diméthylaminophenylalanine permettent de différencier la peptide synthase d'autres enzymes qui peuvent effectuer un échange ATP-pyrophosphate et notamment les aminoacyl-tRNA synthases. Il en est de même pour la N-méthylation de la fonction α -aminée

de la p-diméthylaminophénylalanine acylée sur l'enzyme. C'est donc ce dernier test caractéristique de N-méthylation qui a été utilisé dans cet exemple.

Les fractions enzymatiques à doser (0,2 à 2 unités) sont incubées pendant 15 min à 27°C dans un volume total de 250 µl de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, en présence de 1 µCi de [méthyl-³H] SAM (15 Ci/mmol), de paradiméthylamino-L-phénylalanine (1 mM), d'ATP (2 mM) et de MgCl₂ (5 mM).

La réaction est arrêtée par ajout de 150 µl d'une solution d'acide trichloroacétique à 25 %. Les protéines précipitées sont recueillies sur un microfiltre et lavées par 3 fois 400 µl d'acide trichloroacétique à 7 % avant d'être éluées par 2 fois 400 µl de soude N dans une fiole de comptage contenant 1 ml HCl N et 12 ml de cocktail scintillant (Readygel Beckmann). La quantité de radioactivité contenue dans cette fiole est mesurée avec un compteur à scintillation (Minaxi TriCarb 4000 PACKARD). Elle représente la quantité de paradiméthylaminophénylalanine N-méthylée fixée de façon covalente à la peptide synthase recherchée.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour fixer de manière covalente 1 picomole de p-diméthylaminophénylalanine N-méthylée en 15 min dans les conditions décrites ci-dessus.

5.4.1.B. Purification de la pristinamycine I synthase III.

Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.4.1.A la purification de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus proline et paradiméthylaminophénylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de travailler à 4°C et de conserver à -70°C les fractions actives.

250 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon 0.1 M phosphate pH 7,2, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0,5 M KCl, 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinaespiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 750 ml de tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM contenant 4 mM DTE, 5 mM benzamidine, 0,2 mM Pefabloc, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mg/l leupeptine, 2 mg/l STI, 2 mg/l aprotinine, 1 mg/l E-64, 20 % v/v glycérol. La suspension ainsi obtenue est broyée à l'aide d'une French Press réglée à la pression de 5000 psi puis centrifugée à 50 000 g durant 1 h. L'extrait brut ainsi recueilli est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction

protéique tombant entre 0 et 35 % de saturation en sulfate d'ammonium est redissoute dans le tampon de cassage et dessalée sur une colonne de Sephadex G 25 Fine équilibrée et éluée dans ce même tampon. Les protéines ainsi préparées sont injectées dans le tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 2 mM benzamidine, 2 mg/l leupeptine, 1mg/l E-64, 20 % v/v glycérol sur une colonne (200 ml) de Q-Sepharose Fast Flow, puis sont éluées avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,6 M). A la sortie de la colonne chaque fraction est additionnée d'un dixième de son volume d'une solution de Pefabloc 2 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, benzamidine 5 mM. Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au test décrit à l'exemple 5.4.1.A) sont regroupées et précipitées avec du sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. Les protéines tombées sont redissoutes dans un tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM DTE, 0,2 mM Pefabloc, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mg/l leupeptine, 0,15 M NaCl, 20 % v/v glycérol et injectées en 5 fois par aliquote de 4 ml sur une colonne de perméation Superdex 200 Hi-Load 16/60 équilibrée et éluée dans ce même tampon. Après dosage, les fractions actives sont rassemblées et reconcentrées à 3 ml sur Centriprep 30, puis rediluées jusqu'à 20 ml avec un tampon pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, DTE 4 mM, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 20 % v/v glycérol et appliquées en deux fois sur une colonne MonoQ HR 10/10 équilibrée et éluée avec un gradient linéaire de 0,4 M de KCL dans ce même tampon. Les meilleures fractions contenant l'activité recherchée sont regroupées et servent de matériel pour la caractérisation des activités de l'enzyme et pour son microséquençage.

Après cette étape, l'enzyme est pure et en électrophorèse PAGE-SDS son poids moléculaire est estimé à environ 250 000. Cette bande contient également toute la radioactivité de la protéine marquée par aminoacylation avec la SAM tritiée et la paradiméthylaminophénylalanine. En perméation sur Superose 6 HR 10/30 le poids émoléculaire natif de l'enzyme est estimé à 700 000.

A ce stade l'enzyme est également capable de former des adénylates avec la proline; une réaction d'aminoacylation de l'enzyme avec la proline tritiée est détectée et l'activité maximale en présence de 200 μ Ci/ml de [5- 3 H] L-proline (34 Ci/mme) est de 2490 pmoles/mg en 15 min.

Tableau: Purification de la pristinamycine I synthase III.

Etape de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé ^a (unités /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	800	8100	(4)	-	-
35 % S.A.	200	4000	(6)	-	-
Q-Sepharose	132	498	46	100	1
Superdex 200	45	39,5	417	71	9
MonoQ HR	9	5,3	1070	25	23

a: L'activité dans l'extrait brut et après la précipitation au sulfate d'ammonium ne peut pas être mesurée précisément.

5 Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.4.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique.

Cet exemple décrit comment à partir de séquences internes de la pristinamycine I synthase III il est possible de synthétiser des oligonucléotides.

10 Une séquence interne de la peptide synthase responsable de l'incorporation des résidus proline et paradiméthylaminophénylalanine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA a été réalisée par microséquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. après traitement au bromure de cyanogène et purification des fragments obtenus sur colonne CLHP Vydac C18.

15 Séquence interne à la protéine Pristinamycine I synthase III :

1 (Cf résidus 2 à 20 sur SEO ID n° 13)

1 5 10 15 20

P-VTPYRAYALAHLAG-DDD

20 A partir de la région soulignée dans cette séquence et en fonction de la
dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), le
mélange d'oligonucléotides suivant a été synthétisé:

Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne à la protéine Pristinamycine I synthase III:

5' 3'

GTC ACC CCG TAC CGC GCC TAC

G G C G G

T

5.4.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation en Southern de l'ADN du cosmide pIBV3:

Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des Pristinamycines I peuvent être marqués radioactivement puis
5 hybridés avec une membrane sur laquelle l'ADN du cosmide pIBV3 a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ - ^{32}P]phosphate de l'ATP, par la T4 polynucléotide kinase, comme indiqué dans 5.1.3.

Environ 500 ng du mélange d'oligonucléotides a été ainsi marqué au ^{32}P et a
10 été utilisé pour hybrider en Southern de l'ADN de pIBV3 digéré par différentes enzymes. Ces hybridations ont permis de montrer qu'une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase III était portée par le cosmide pIBV3 et d'identifier la région contenant ce gène. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

15 Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV3 possédait un fragment SphI de 8,4 kb, contenant la séquence homologue à la sonde synthétisée dans l'exemple 5.4.2.

5.5. Mise en évidence de la présence d'une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase IV (SnbE) sur le cosmide pIBV3.

20 Cet exemple illustre comment il est possible d'identifier la présence de gènes de biosynthèse des Pristinamycines I sur un cosmide déjà isolé (Exemple 5.1).

5.5.1. Identification de la peptide synthase (appelée Pristinamycine I synthase IV) responsable de l'incorporation du résidu phénylglycine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA.

25 5.5.1.A. Dosage d'activités enzymatiques portées par la peptide synthase (Pristinamycine I synthase IV) responsable de l'incorporation du résidu phénylglycine dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA.

Cet exemple illustre le dosage d'une activité enzymatique de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA qui n'a pas été décrite à ce jour, et qui possède
30 la propriété remarquable de n'être exprimée que durant la période de production des Pristinamycines dans le microorganisme sauvage. Il s'agit de l'activité de la peptide synthase (Pristinamycine I synthase IV) responsable de l'incorporation du résidu L-phénylglycine dans la chaîne peptidique (figure 12) en présence d'ATP et de

MgCl₂. L'activité phénylglycine-AMP ligase de la Pristinamycine I synthase IV est mesurée dans un test enzymatique d'échange ATP-pyrophosphate similaire à celui décrit en 5.2.1.A. pour l'activité acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, en présence de de L-phénylglycine (1 mM) et de KCl (50 mM) dans le tampon d'incubation.

5.5.1.B. Purification de la peptide synthase responsable de l'incorporation du résidu phénylglycine (Pristinamycine I synthase IV) dans la chaîne peptidique de la Pristinamycine IA.

Cet exemple illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée. En utilisant le dosage décrit précédemment à l'exemple 5.5.1.A. La purification de la Pristinamycine I synthase IV est réalisée comme décrit ci-dessous. Toutes les opérations sont effectuées à 4°C. Les fractions contenant l'activité sont immédiatement congelées et conservées à -70°C.

70 g de cellules humides récoltées comme décrit dans l'exemple 5.2.1.B. sont resuspendus dans 250 ml de tampon de lyse cellulaire (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contenant 25 % de glycérol, 4 mM DTE, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/l E64, 2 mg/l STI, 2 mg/l α2 macroglobuline, 1 mg/l leupeptine, 2 mg/l aprotinine, 5 mM benzamidine, 0.6 mg/ml lysozyme. La solution ainsi obtenue est maintenue 1 heure à 4°C sous agitation puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. Le surnageant est ensuite injecté dans le tampon de lyse cellulaire sur une colonne de sephadex-G-25, et la fraction exclue (environ 250 mg de protéines injectés lors de chaque chromatographie) est injectée sur une colonne de Mono Q HR 16/10 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,0, 4 mM DTE, 1 mg/l E-64, 2 mg/l STI, 20 % glycérol. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 0,6 M de KCl et, à la sortie de la colonne, chaque fraction est additionnée d'un 10ème de son volume d'une solution de Pefabloc 2mM, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA. Les fractions contenant l'activité sont regroupées puis mélangées avec 1 volume de Tris-HCl 100 mM pH 8,0, 15 % glycérol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 4 mM DTT, 3,4 M sulfate d'ammonium pour 3 volumes de fraction. La solution est injectée sur une colonne de Phényl-Superose HR 10/10 (le cinquième de la solution est injecté à chaque chromatographie), et les protéines sont éluées avec un gradient linéaire décroissant de 0,9 à 0 M de sulfate d'ammonium. Les fractions contenant l'activité sont regroupées. La solution est concentrée à 3500 µl dans un Centriprep 30 et injectée en 2 fois sur une colonne Superdex 200 Hi-Load

16/60 équilibrée et éluée avec du tampon bis-tris propane 50 mM pH 6,8 contenant 20 % de glycérol, 0,15 M NaCl, 4 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 mM EDTA. La fraction active est diluée par 9 volumes de tampon bis-tris propane 50 mM pH 6,8 contenant 25 % de glycérol, 4 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, puis injectée sur une colonne de Mono Q HR 5/5 équilibrée dans le même tampon. L'activité recherchée est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 0,4 M de KCl, et concentrée à 630 µl dans un Centricon-30. La protéine recherchée est ensuite purifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 6 % après dénaturation de l'échantillon par chauffage 10 min à 80°C avec un mélange SDS-mercaptoéthanol. Après électrophorèse et coloration du gel au bleu de Coomassie, la bande de gel contenant la protéine est découpée et la protéine est électroéluee du gel dans un Centrilutor.

Remarque: la bande correspondant à la Pristinamycine I synthase IV est identifiée par comparaison avec un standard de Pristinamycine I synthase IV tritiée (par liaison covalente à la phénylglycine tritiée; voir description dans l'exemple 5.5.2.).

Après cette étape, l'enzyme est pure en électrophorèse (PAGE-SDS). Son poids moléculaire est estimé à environ 170 000.

5.5.2. Marquage de la Pristinamycine I synthase IV par thioestérification de la phénylglycine radioactive sur l'enzyme.

Après activation sous forme d'adénylate par l'activité phénylglycine-AMP ligase, la phénylglycine est transférée sur un groupement thiol du site actif de l'enzyme avant d'être incorporée dans la chaîne peptidique en cours d'élongation (processus général de la biosynthèse des antibiotiques peptidique connu sous le nom de "thiotemplate mechanism"). De façon générale, le marquage radioactif de la protéine effectuant l'activation d'un acide aminé peut donc être effectué en préparant le dérivé thioester avec une forme radioactive de l'acide aminé.

A titre d'exemple, le marquage radioactif de la Pristinamycine I synthase IV est effectué en incubant durant 1 heure à 27°C, 50 µg de la protéine (fraction active en sortie de la colonne de chromatographie Mono Q HR 5/5 ; voir ci-dessus dans l'exemple 5.5.1.B.) avec 100 µCi de (R,S)-2-phényl[2-³H]glycine (18 Ci/mmol; Amersham) dans 70 µl de tampon bis-tris propane 50 mM pH 6,8 contenant 20 % de glycérol, 25 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0,15 M NaCl, 4 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 mM EDTA. Après dénaturation (SDS seul sans mercaptoéthanol), les protéines sont séparées par électrophorèse (PAGE-SDS, gel à 6 %) et

révélées au bleu de Coomassie. L'analyse du profil de radioactivité par comptage des bandes de protéines ainsi que par autoradiographie (Hyperfilm MP; fluorographie après imprégnation du gel avec Amplify Amersham) révèle une seule bande radioactive au poids moléculaire de 170 000.

5 Tableau: purification de la Pristinamycine I synthase IV.

Etape de Purification	Protéines (mg)	Act. Spé. (cpm/mg) ^a	Protéines (mg)	Facteur de purification
Extrait brut	2200	3,6	-	-
Mono Q 16/10	136	58	100	16
Phényl-Superose	32,6	175	72	49
Superdex-200	3,1	870	34	240
Mono Q 5/5	2,0	1000	25	280
Electroélution PAGE-SDS	0,1	-	-	-

^aL'activité spécifique ne peut pas être mesurée précisément dans l'extrait brut en raison du niveau élevé d'échange ATP-pyrophosphate non dépendant de la phénylglycine. La valeur de l'activité spécifique a été calculée à partir du nombre
10 d'unités retrouvées en sortie de première étape chromatographique rapporté à la quantité de protéines dans l'extrait brut.

5.5.3. Autres activités portées par la Pristinamycine I synthase IV.

La purification de la peptide synthase responsable de l'incorporation de la phénylglycine décrite dans l'exemple 5.5.2. a conduit à une protéine pure de poids
15 moléculaire 170 000. Cette protéine n'active pas les autres acides aminés testés, en particulier l'acide pipécolique ou l'acide 4-oxopipécolique. Une seconde préparation de cette protéine, effectuée dans les conditions décrites en 5.5.1.B., en supprimant toutefois l'étape de Phényl-Superose, à partir d'une autre culture de *S. pristinaespiralis* SP92 dont l'extrait brut a été préparé à la French Press comme décrit
20 en 5.4.1B, a conduit à une protéine qui, en sortie de l'étape de Mono Q HR 5/5, était de pureté équivalente à celle obtenue à la même étape dans l'exemple décrit en 5.5.1.B., mais présentait un poids moléculaire de 250 000 environ en PAGE-SDS. Cette nouvelle préparation était compétente pour l'activation et la thioestérification de la phénylglycine, mais possédait en outre une activité d'échange ATP-pyrophosphate avec l'acide L-pipécolique (1 mM) dans le test d'échange analogue à
25 celui décrit en 5.2.1.A. pour l'acide 3-hydroxypicolinique. D'autre part, il a pu être montré que la protéine de 170 000 ne possède pas d'activité d'échange ATP-

pyrophosphate avec l'acide L-pipécolique, même dans les préparations encore très impures de la protéine. Il est à noter que S. pristinaespiralis SP92 produit naturellement en faible quantité un analogue de la Pristinamycine IA ayant un résidu acide pipécolique en lieu et place de l'acide 4-oxopipécolique. Ceci démontre donc

5 que la peptide synthase responsable de l'incorporation de la phénylglycine (la Pristinamycine I synthase IV) catalyse aussi l'incorporation du résidu précédent (vraisemblablement l'acide pipécolique). La différence de poids moléculaire obtenue pour la Pristinamycine I synthase IV dans les deux préparations (170 000 et 250 000) est attribuée à un phénomène de clivage protéolytique partiel dans le

10 premier cas, conduisant à la perte de l'activité d'activation de l'acide L-pipécolique.

5.5.4. Synthèse d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique.

Cet exemple décrit comment à partir d'une séquence interne de la Pristinamycine I synthase IV, il est possible d'aller rechercher le gène correspondant à l'aide d'oligonucléotides convenablement choisis.

15 Une séquence interne de la Pristinamycine I synthase IV de 15 acides aminés a été identifiée après clivage au bromure de cyanogène de la protéine purifiée et purification des fragments obtenus sur colonne CLHP Vydac C18.

Séquence interne à la protéine Pristinamycine I synthase IV :

(Cf résidus 82 à 98 sur SEQ ID n° 16)

20 1 5 10 15
V T V F L N N T R L I O N F R P R - F - G D

A partir de la région soulignée dans cette séquence et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), le mélange d'oligonucléotides suivant a été synthétisé :

25 Mélange correspondant à la partie soulignée de la séquence interne de la protéine Pristinamycine I synthase IV:

5' 3'
A C G C G C C T C A T C C A G A A C T T C C G C C C
C G G G
30 T T

5.5.5. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation en Southern de l'ADN du cosmide pIBV3:

Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse de la Pristinamycines I peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec une membrane sur laquelle l'ADN du cosmide pIBV3 a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ - ^{32}P]phosphate de l'ATP, par la T4 polynucléotide kinase, comme indiqué dans 5.1.3.

Environ 500 ng du mélange d'oligonucléotides a été ainsi marqué au ^{32}P et a été utilisé pour hybrider en Southern de l'ADN de pIBV3 digéré par différentes enzymes. Ces hybridations ont permis de montrer que le gène de structure de la Pristinamycine I Synthase IV était porté par le cosmide pIBV3 et d'identifier la région contenant ce gène. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV3 possédait un fragment *Sph*I de 6,6 kb, contenant la séquence homologue aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.5.4.

5.6. Isolement du cosmide pIBV4 contenant le gène de structure de la FMN réductase (snaC).

Cet exemple illustre comment il est possible d'obtenir un cosmide, tel que construit à l'exemple 3., contenant au moins un gène de biosynthèse des PII.

5.6.1. Identification de la FMN réductase associée à la Pristinamycine IIA synthase.

Cet exemple illustre comment la protéine responsable de la réduction du FMN par le NADH pour former le FMNH₂ nécessaire à la réaction catalysée par la Pristinamycine IIA synthase peut être purifiée jusqu'à homogénéité à partir de *S.pristinaespiralis* SP92.

5.6.1.A. Dosage de l'activité FMN réductase.

Cet exemple illustre le dosage d'une activité de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA qui n'a encore jamais été décrite et qui possède la propriété remarquable de n'être exprimée que pendant la période de production des Pristinamycines. Il s'agit de la FMN réductase, appelée encore NADH:FMN oxydoréductase, qui catalyse la réduction du FMN en FMNH₂ (figure 13) en présence de NADH. Des FMN réductases catalysant la même réaction, spécifiques ou non pour le NADH ou le NADPH, associées à d'autres voies de biosynthèse ont

été décrites par ailleurs (Duane *et al.*, 1975, Jablonski *et al.*, 1977, Watanabe *et al.*, 1982).

Deux dosages sont utilisés pour détecter cette activité :

Le premier repose sur un couplage avec la Pristinamycine IIA synthase décrite dans l'exemple 5.1.1. et est utilisé pour les premières étapes de la purification. Les fractions enzymatiques à doser (0,002 à 0,005 unités) sont incubées 1 heure à 27°C dans un volume total de 500 µl de tampon bis-tris-propane 50mM pH 6,8 contenant NADH (500 µM), FMN (2 µM), Pristinamycine IIB (20 µM) et 0,01 unités de Pristinamycine IIA synthase décrite dans l'exemple 5.1.1. La Pristinamycine IIA formée est dosée par CLHP comme décrit à l'exemple 5.1.1.A.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour synthétiser 1 µmole de Pristinamycine IIA par minute dans les conditions décrites ci-dessus.

Le second est un dosage spectrophotométrique et ne peut être employé qu'avec des fractions purifiées au moins partiellement. Les fractions enzymatiques à doser (0,006 à 0,030 unités) sont incubées 13 min à 27°C dans un volume total de 3 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant NADH (500 µM) et FMN (2 µM). Après 7 min d'incubation, 6 lectures de la densité optique à 340 nm espacées de 1 min sont effectuées contre une cuve de référence sans enzyme. L'activité en µmol/min est calculée en divisant la pente de diminution par min de la densité optique par un facteur 6,2 (densité optique de 1 mole de NADH à 340 nm).

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour consommer 1 µmole de NADH par minute dans les conditions décrites ci-dessus.

5.6.1.B. Purification de la FMN réductase de *S. pristinaespiralis* SP92.

Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IIA peut être purifiée.

En utilisant les dosages décrits précédemment à l'exemple 5.6.1.A. la purification de la FMN réductase est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler et conserver les fractions actives à -30°C entre chaque étape si nécessaire.

500 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinaespiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris par 1500 ml de tampon bis-tris-propane 50 mM pH 6,8 contenant 5 mM de DTT, 10 % v/v de glycérol et

0,2 mg/ml de lysozyme. La suspension ainsi obtenue est incubée pendant 45 min à 27°C puis centrifugée à 50 000 g durant 1 heure. L'extrait brut ainsi recueilli est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction protéique précipitant entre 40 et 75 % de saturation est dessalée sur une colonne de Sephadex G25 Fine puis injectée dans le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 5 mM, 10 % v/v de glycérol sur une colonne (300 ml) de Q-Sepharose Fast Flow. Les protéines actives ne sont pas retenues sur la colonne et elles sont dessalées sur une colonne de Sephadex G25 Fine puis réinjectées dans le tampon pH 8,2 Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, 10 % v/v de glycérol sur une colonne (35 ml) de Q-Sepharose Fast Flow et élues avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,5M). Les fractions contenant l'activité enzymatique (mises en évidence grâce au premier test décrit à l'exemple 5.6.1.A) sont regroupées, dessalées sur une colonne de Sephadex G25 Fine puis injectées dans le tampon pH 8,2 Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, 10 % v/v de glycérol sur une colonne MonoQ HR 10/10. Les protéines retenues sont élues directement par le même tampon auquel on a ajouté 0,2 M de KCl. Elles sont recueillies dans un volume de 1 ml réinjecté immédiatement sur une colonne de Superdex 75 HR 10/30 élue avec le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol. Les fractions contenant l'activité recherchée (mises en évidence à partir de cette étape grâce au test spectrophotométrique comme décrit à l'exemple 5.6.1.A) sont rassemblées et le volume total du pool amené à 7 ml ; ces 7 ml sont injectés sur une colonne remplie de 8 ml de FMN agarose ; la colonne est lavée par le tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM, DTT 1 mM, 10 % v/v de glycérol, puis élue avec le même tampon contenant 10 µM de FMN. Les fractions actives sont rassemblées, dessalées sur des colonnes PD-10 et injectées dans le tampon pH 8,2 tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, 10 % v/v de glycérol sur une colonne MonoQ HR 5/5 et élues avec un gradient linéaire de KCl (0 à 0,25 M).

Après cette étape, l'enzyme est pure. En électrophorèse PAGE-SDS une seule bande assez large apparaît, centrée à un poids moléculaire estimé à 28 000, tandis qu'en chromatographie de perméation de gel Bio-Sil SEC 125 cette protéine forme un pic symétrique centré sur un poids moléculaire d'environ 30 000.

Pour le séquençage, la protéine est dessalée sur colonne Vydac C4 de 25 cm élue avec un gradient linéaire de 30 à 70 % d'acétonitrile dans l'eau à 0,07 % d'acide trifluoroacétique.

Tableau: Purification de la FMN réductase

Etapas de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé ^{a,b} (unités /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	1620	5100	0,004 ^a	100	1
40-75 % S.A.	155	2930	0,005 ^a	68	1,2
Q-Seph. pH 6,8	357	180	0,058 ^a	49	14
Q-Seph. pH 8,2	153	15	0,36 ^a	25	85
MonoQ HR 10/10	1,0	8	0,50 ^a 4,4 ^b	19	120
Superdex 75	1,5	3,1	7,4 ^b	12	200
FMN-agarose	7,5	0,28	96 ^b	14	2600
MonoQ HR 5/5	3,0	0,29	68 ^b	11	1900
Bio-Sil 125	7,5	0,18	106 ^b	10	2900

a: dosage couplé à la Pristinamycine IIA synthase
b: dosage spectrophotométrique

5 Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.6.2. Réalisation d'oligonucléotides à partir de la séquence protéique.

Cet exemple décrit comment à partir des séquences NH₂-terminales et internes de la protéine FMN réductase, il est possible de synthétiser des oliginucléotides.

10 La séquence NH₂-terminale de la FMN réductase a été réalisée par micro-séquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. Une trentaine de résidus ont été ainsi identifiés.

(Des séquences NH₂-terminales démarrant au 4ème et au 11ème résidus ont été également trouvées dans l'échantillon séquencé.)

15 Deux séquences internes à la FMN réductase, de 13 et 21 acides aminés, ont été également identifiées, après hydrolyse trypsique et purification des fragments obtenus sur colonne Vydac C18.

Séquence NH₂-terminale de la protéine FMN réductase :
(Cf résidus 2 à 25 sur SEQ ID n° 7)

20 1 5 10 15 20 25
T G A D D P A R P A V G P Q S E R D A M A Q L A S P V

Séquences internes de la protéine FMN réductase :

(Cf résidus 102 à 122 sur SEQ ID n° 7)

1 5 10 15 20
FAGGEFAAWDGTGVPYLPDAK

5 (Cf résidus 149 à 161 sur SEQ ID n° 7)

1 5 10
~~TGDP~~AKPPLLWYR

A partir des régions soulignées dans chacune des séquences et en fonction de la dégénérescence du code génétique spécifique des Streptomyces (cf. Exemple 8), les
10 mélanges d'oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

Mélange correspondant à la séquence NH₂-terminale de la protéine FMN
réductase :

5' 3'

TTC CGC GAC GCC ATG GCC CAG CTC GC

15 G G G G

Mélanges correspondant aux séquences internes de la protéine FMN réductase :

5' **TTC GCC GGC GGC GAG TTC GCC GCC TGG GAC GGC ACC GG** 3'
 G G G G G G
 20 5' **GAC CCC GCC AAG CCC CCC CTG CTG TGG TAC CG** 3'
 G G G G C C

5.6.3. Marquage des mélanges d'oligonucléotides synthétiques et hybridation des banques d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92.

25 Cet exemple décrit comment des oligonucléotides spécifiques d'un gène de biosynthèse des pristinamycines peuvent être marqués radioactivement puis hybridés avec des membranes sur lesquelles l'ADN des banques génomiques de S. pristinaespiralis a été transféré.

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par transfert en position 5' terminale, du groupement [γ - ^{32}P]phosphate de l'ATP marqué, par la T4 polynucléotide kinase, comme indiqué dans 5.1.3.

Environ 2 x 500 ng de chaque mélange d'oligonucléotides ont été ainsi marqués au ^{32}P et ont été utilisés pour hybrider chacune des deux banques.

L'hybridation des membranes de chaque banque a été réalisée comme indiqué dans l'exemple 5.1.3.

5 5.6.4. Isolement du cosmide pIBV4 et détermination de la région contenant le gène de structure de la FMN réductase (snaC).

Le cosmide pIBV4 a été isolé d'un clone de la banque réalisée dans la souche d'E.coli HB101, ayant hybridé avec les trois mélanges d'oligonucléotides simultanément.

10 Ce cosmide a été purifié comme décrit dans l'exemple 2. Il contient un insert d'ADN génomique de S. pristinaespiralis SP92 dont la taille a été estimée à 48 kb. Une cartographie (figure 7) a été établie à partir de digestions avec différentes enzymes de restriction, comme indiqué dans 5.1.4.

15 Des hybridations en Southern de l'ADN de pIBV4 digéré par différentes enzymes, avec les mélanges d'oligonucléotides, ont permis d'identifier la région contenant snaC, le gène de structure de la FMN réductase. Les Southern et les hybridations ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 5.1.4.

20 Les résultats d'hybridation ont permis de montrer que le cosmide pIBV4 possédait un fragment BamHI-BamHI de 4 kb, contenant les séquences homologues aux sondes synthétisées dans l'exemple 5.6.3.

5.7. Mise en évidence de la présence du gène de structure de la p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase sur le cosmide pIBV2.

25 Cet exemple illustre comment il est possible, à partir d'une protéine purifiée, d'identifier le gène de structure correspondant parmi les gènes déjà analysés et séquencés comme décrit à l'exemple 6.7 et 7.8, et également exprimés chez E.coli comme décrit à l'exemple 11.

5.7.1. Identification et purification de la protéine impliquée dans la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine.

30 Cet exemple illustre comment la protéine responsable de la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine [la p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase], peut être purifiée jusqu'à homogénéité, à partir de la souche S. pristinaespiralis SP92 et comment on peut également l'obtenir pure à partir d'une souche recombinante de E. coli (exemple 11).

5.7.1.A. Dosage de l'activité de méthylation de la p-aminophénylalanine en p-méthylaminophénylalanine et de l'activité de méthylation de la p-méthylaminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine.

Cet exemple illustre le dosage de deux activités terminales de la biosynthèse de la p-diméthylaminophénylalanine, composant de pristinamycine IA. Ces activités n'ont jamais encore été décrites et possèdent la propriété remarquable de n'être exprimées que pendant la période de production des pristinamycines. Il s'agit de la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-méthylaminophénylalanine (méthylation 1), d'une part, et de la méthylation de la p-méthylaminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine (méthylation 2), ces deux activités utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle (figure 14).

Les fractions enzymatiques à doser (1 à 20 unités) sont incubées pendant 30 min à 27°C dans un volume total de 200 µl de tampon pH 6,8 bis-tris-propane 50 mM contenant de la SAM (200 µM) dont le groupement méthyle est marqué radioactivement avec l'isotope 14 de l'atome de carbone (2 Ci/mol), en présence de p-amino-L-phénylalanine (1 mM) pour le dosage de la méthylation 1 ou de p-méthylamino-L-phénylalanine (2,5 mM) pour le dosage de la méthylation 2.

La réaction est arrêtée par ajout de 16 µl d'acide chlorhydrique à 37 % puis de 20 µl d'heptanesulfonate de sodium à 240 g/l. Après centrifugation, 150 µl de surnageant sont injectés dans le système de CLHP en mode gradient suivant :

- phase mobile : éluant A = 1,2 g d'heptanesulfonate de sodium + 2,5 ml d'acide acétique glacial + eau (qsp 1000 ml)

éluant B = 1,2 g d'heptanesulfonate de sodium + 2,5 ml d'acide acétique glacial + 300 ml d'acétonitrile + eau (qsp 1000 ml)

gradient :	t (min)	% B
	0	30
	16	30
	17	100
	20	100
	21	30
	25	30

- phase stationnaire : colonne Nucléosil C18 5 µm 150 x 4,6 mm (Macherey-Nagel)

En sortie de colonne, les substrats et produits de la réaction enzymatique sont quantifiés par absorption à 254 nm. Cette détection est couplée à une détection radiochimique en ligne au moyen d'un détecteur Berthold LB506 équipé d'une cellule à scintillation solide de type GT400-U4. Ceci permet de suivre
5 spécifiquement l'incorporation de groupements méthyles radioactifs dans les produits de la réaction.

L'unité d'activité enzymatique pour la méthylation 1 (pour la méthylation 2) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour incorporer 1 nmole de groupement méthyle dans la p-aminophénylalanine (dans la p-méthylamino-
10 phénylalanine).

5.7.1.B. Purification à partir de *S. pristinaespiralis* SP92 de la N-méthyltransférase SAM-dépendante catalysant la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine [p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase].

15 Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. pristinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment dans l'exemple 5.7.1.A, la purification de la N-méthyltransférase SAM-dépendante est réalisée comme décrit ci-dessous en prenant soin de congeler et conserver à -70°C les fractions actives
20 entre chaque étape si nécessaire.

240 g d'un culot de centrifugation, lavé par un tampon pH 7,2 phosphate 100 mM, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0,5M KCl, 10 % v/v de glycérol, d'une culture de *S. pristinaespiralis* SP92 récoltée en début de phase de production des Pristinamycines sont repris dans 480 ml de tampon pH 8,0 Tris-HCl
25 0,1 M contenant 4 mM DTE, 5 mM benzamidine, 0,2 mM Pefabloc, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mg/l STI, 2 mg/l aprotinine, 20 % v/v glycérol et 2 mg/ml lysozyme, ce tampon étant maintenu à +4°C. La suspension ainsi obtenue est vigoureusement agitée à 4°C. Après 30 min d'agitation, sont ajoutés 0,2 mg/ml désoxyribonucléase I et 5 mM MgCl₂. Après 90 min d'agitation, l'extrait
30 est centrifugé pendant 1 heure à 50 000 g. Le surnageant est réparti en 3 fractions d'environ 180 ml. Chacune est dessalée par perméation de gel sur une colonne de 500 ml de Sephadex G 25 Fine équilibrée au débit naturel dans un tampon pH 6,8 bis-tris 20 mM, contenant 4 mM DTE, 5 mM benzamidine, 0,2 mM Pefabloc, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mg/l STI, 2 mg/l
35 aprotinine, 20 % v/v glycérol. L'éluat protéique est alors chromatographié (400 mg

de protéine à chaque cycle) sur une colonne MonoQ HR 16/10 à un débit de 6 ml/min avec un gradient linéaire croissant de chlorure de sodium (0 à 0,3 M) dans un tampon pH 6,8 bis-tris 20 mM, contenant 4 mM DTE, 2 mM benzamidine, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 20 % v/v glycérol. A la sortie de la colonne, les

5 fractions sont complétées par 10 % v/v de tampon pH 6,8 bis-tris 20 mM, contenant 4 mM DTE, 30 mM benzamidine, 2mM Pefabloc, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mg/l STI, 10 mg/l aprotinine, 20 % v/v glycérol. Dans ces conditions, les deux activités de méthylation (1 et 2) sont détectées de façon identique dans les fractions d'exclusion et les premières fractions d'élution. Ces

10 fractions sont regroupées, concentrées par ultrafiltration sur CentriPrep 10. Ce concentrat est amené à 0,85 M de sulfate d'ammonium puis chromatographié (20 à 80 mg à chaque cycle) sur une colonne Phényl-Superose HR 10/10 à un débit de 1 ml/min avec un gradient linéaire décroissant de sulfate d'ammonium (0,85 à 0 M) dans un tampon pH 6,8 bis-tris 50 mM, contenant 4 mM DTE, 2 mM benzamidine,

15 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % v/v glycérol. A la sortie de la colonne, les fractions sont complétées par 10 % v/v de tampon pH 6,8 bis-tris 50 mM, contenant 4 mM DTE, 30 mM benzamidine, 2mM Pefabloc, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mg/l STI, 10 mg/l aprotinine, 10 % v/v glycérol. Dans ces conditions, les deux activités de méthylation

20 (1 et 2) sont détectées de façon identique dans les fractions d'élution correspondant à environ 0,15 M sulfate d'ammonium. Ces fractions sont regroupées, concentrées par ultrafiltration sur Centricon 10, dessalées sur colonnes PD-10 équilibrées dans un tampon pH 8,2 (à 5°C) Tris 50 mM, contenant 4 mM DTE, 2 mM benzamidine, 100 µg/l E-64, 2 mg/l leupeptine, 20 % v/v glycérol, puis chromatographiées

25 (environ 10 mg à chaque cycle) sur colonne MonoQ HR 5/5 équilibrée dans le même tampon à un débit de 1 ml/min. Dans ces conditions, les deux activités ne sont pas retenues sur la colonne. A la sortie de la colonne, les fractions d'exclusion contenant donc ces deux activités sont complétées par 10 % v/v de tampon pH 8,2 Tris 50 mM, contenant 4 mM DTE, 30 mM benzamidine, 2 mM Pefabloc, 100 µg/l E-64, 2 mg/l

30 leupeptine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 % v/v glycérol. Ces fractions sont alors concentrées par ultrafiltration sur Centricon 10 puis chromatographiées sur colonne TSK G2000 SW 300 x 7,5 mm 10 µm équilibrée à un débit de 0,5 ml/min dans un tampon pH 7,0 Hepes 50 mM, contenant 4 mM DTE, 0.2 mM Pefabloc, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % v/v glycérol, 0.15 M chlorure de sodium. Les deux

35 activités co-éluent dans cette technique à un temps de rétention correspondant à un

poids moléculaire proche de 30 000. Après cette étape, une protéine majoritaire est visible en SDS-PAGE. Elle se situe aux environs de 32 000.

Tableau : Purification de l'enzyme de méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine.

5

Etapas de purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé (unités ^a /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	510	1800	29	-	-
G25 Fine	560	1560	34	102	1,17
MonoQ HR 16/10	670	82	430	67	14,8
Phényl-Superose	10	3,48	6300	42	217
MonoQ HR5/5	7	0,88	17200	29	593
TSK G2000	0,8	0,113	40300	8,7	1390

^a Il s'agit des unités d'activité enzymatique pour la méthylation 1. A chaque étape la valeur des unités d'activité enzymatique pour la méthylation 2 était égale à 120 % de celle des unités pour la méthylation 1.

Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

10

5.7.1.C. Purification à partir de *E. coli*::pVRC706 de la protéine recombinante de *S. pristinaespiralis* SP92 présentant l'activité N-méthyltransférase SAM-dépendante catalysant la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine.

15 Cette expérience illustre comment une enzyme de *S. prisinaespiralis* SP92 intervenant dans la voie de biosynthèse de la Pristinamycine IA et exprimée chez *E. coli* par clonage du gène *papM* peut être purifiée.

En utilisant le dosage décrit précédemment dans l'exemple 5.7.1.A., nous avons montré que les extraits bruts de la souche recombinante *E. coli*::pVRC706 20 présentent une forte activité pour la méthylation 1 et pour la méthylation 2, alors que dans la souche *E. coli* témoin (pMTL23) aucune de ces deux activités n'a été détectée. La purification de la p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase SAM-dépendante catalysant la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine a été alors réalisée.

25 Dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 5.7.1.B., excepté une étape de chromatographie qui a été supprimée (l'étape de purification sur MonoQ HR 5/5), nous avons purifié à homogénéité une protéine qui présente un poids

moléculaire en chromatographie sur colonne TSK G2000 et en SDS-PAGE identique à celui présenté par la protéine purifiée dans l'exemple 5.7.1.B.

Tableau : Purification de l'enzyme de méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine à partir de la souche *E. coli*::pVRC706.

5

Etape de Purification	vol. (ml)	Protéines (mg)	Act. Spé (unités ^a /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	15	190	235	-	-
G25 Fine	22	175	231	91	1
MonoQ HR16/10	24	13,4	2100	63	8,9
Phényl-Superose	3,0	0,39	35500	31	145
TSK G2000	0,8	0,092	45200	9,3	192

^a Il s'agit des unités d'activité enzymatique pour la méthylation 1. A chaque étape la valeur des unités d'activité enzymatique pour la méthylation 2 était égale à 120 % de celle des unités pour la méthylation 1.

10 Le facteur de purification est calculé d'après l'augmentation de l'activité spécifique des fractions au cours de la purification.

5.7.2. Identification du gène de structure de la p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase.

La séquence NH₂-terminale de la protéine de 32 000 purifiée à l'exemple 5.7.1.B. a été déterminée par microséquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2.
15 Une dizaine de résidus ont été ainsi déterminés :

TAAAPTLAQA

La séquence NH₂-terminale de la protéine de 32 000 purifiée à l'exemple 5.7.1.C a été déterminée par microséquençage comme décrit dans l'exemple 5.1.2. Une dizaine de résidus ont été ainsi déterminés :

20

TAAAPTLAQA

Il s'agit dans les deux cas des mêmes résidus et cette séquence correspond exactement au début de la séquence protéique qui est déduite de la séquence du gène *papM* (résidus 2 à 11 sur SEQ ID n° 10). La p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase purifiée est donc la protéine PapM.

EXEMPLE 6 : Sous clonage des fragments d'ADN clonés dans des cosmides tels que préparés dans l'exemple 3 et contenant les gènes d'intérêt.

Cet exemple illustre comment à partir des cosmides construits comme décrit à l'exemple 3 et contenant des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II ou des Pristinamycines I, il est possible de sous cloner des fragments d'ADN contenant ces gènes.

Ces sous clonages ont été effectués afin de pouvoir réaliser ultérieurement la séquence nucléique des gènes identifiés ainsi que les différentes constructions présentées dans les exemples suivants.

10 6.1. Isolement du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant ce gène.

15 Environ 10 µg du cosmide pIBV2 ont été coupés successivement par les enzymes de restriction BglII et EcoRI (New England Biolabs) dans les conditions préconisées par le fournisseur. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-EcoRI de 5,5 kb a été isolé par électroélution comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989).

20 Environ 100 ng de pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) coupés par BamHI et EcoRI ont été ligués avec 200 ng du fragment BglII-EcoRI de 5,5 kb, dans les conditions décrites dans l'exemple 3.3.

Après transformation de la souche TG1 et sélection des transformants sur milieu LB solide contenant 150 µg/ml d'ampicilline et 20 µg/ml de X-gal, selon la technique décrite par Maniatis *et al.* (1989), un clone portant le fragment souhaité a été isolé. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC402. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 15(A). Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.2., que le fragment EcoRI-BglII de 5,5 kb, contient le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de *S. pristinaespiralis* SP92. Le plasmide pVRC402 contient donc le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase de *S. pristinaespiralis* SP92.

25

30

6.2. Isolement d'un fragment BglII-BglII de 4.6 kb à partir du cosmide pIBV2.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, dans le but d'identifier dans les régions adjacentes au gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, la présence d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV2 ont été coupés par BglII. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BglII-BglII de 4.6 kb a été isolé par électroélution.

Environ 100 ng de pUC19 coupés par BamHI ont été ligués avec 200 ng du fragment BglII-BglII.

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1 comme décrit dans l'exemple 6.1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC501. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 15(B).

6.3. Isolement du fragment BamHI-BamHI de 6 kb contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA synthase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV1, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant les gènes de structure des deux sous-unités de la Pristinamycine IIA-synthase.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV1 ont été coupés par BamHI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et le fragment BamHI de 6 kb a été isolé par électroélution.

Environ 100 ng de pBKS⁻ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla Californie) coupés par BamHI, ont été ligués avec 200 ng du fragment BamHI de 6 kb.

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pXL2045. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 16. Il a été montré par hybridation, dans l'exemple 5.1, que le fragment BamHI de 6 kb, contient les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92. Le plasmide pXL2045 contient donc les gènes snaA et snaB, codant pour les deux sous unités de la Pristinamycine IIA-synthase de S. pristinaespiralis SP92.

6.4. Isolement du fragment SphI de 6.2 kb contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV3, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV3 ont été coupés par SphI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 % et le fragment SphI de 6,2 kb a été isolé par la technique du kit "GeneClean" commercialisé par la société Bio101-Ozyme.

Environ 100 ng de pUC19 coupés par SphI ont été ligués avec 200 ng du fragment SphI de 6,2 kb.

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC1105. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 17.

6.5. Isolement du fragment SphI de 8.4 kb contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase III.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV3, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase III.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV3 ont été coupés par SphI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 % et le fragment SphI de 8,4 kb a été isolé par la technique du kit "GeneClean" commercialisé par la société Bio101-Ozyme.

Environ 100 ng de pUC19 coupés par SphI ont été ligués avec 200 ng du fragment SphI de 8,4 kb.

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC1106. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 18.

6.6. Isolement du fragment SphI de 6.6 kb contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase IV.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV3, il est possible de sous cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase IV.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV3 ont été coupés par SphI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 % et le fragment SphI de 6,6 kb a été isolé par la technique du kit "Geneclean" commercialisé par la société Bio101-Ozyme.

Environ 100 ng de pUC19 coupés par SphI ont été ligués avec 200 ng du fragment SphI de 6,6 kb .

Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC1104. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 19.

6.7. Isolement du fragment HindIII-HindIII de 17 kb contenant le cosmide pH79 et portant les gènes situés en amont de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (Pristinamycine I synthase I).

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV2, contenant le gène de structure de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase, il est possible de déléter une grande partie de ce cosmide pour ne garder que la partie située en amont de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase.

Environ 200 ng du cosmide pIBV2 ont été coupés par l'enzyme de restriction HindIII. L'enzyme a été dénaturé 30 min à 85°C, comme préconisé par le fournisseur. Le cosmide pIBV2 ainsi digéré a été précipité à l'éthanol comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989) et religuaturé sur lui-même dans un volume de 50 µl.

Après transformation de la souche TG1 et sélection des transformants sur LB solide + 150 µg/ml d'ampicilline selon la technique décrite par Maniatis *et al.* (1989), un clone contenant le cosmide pH79 et la partie située en amont de l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (l'ensemble correspondant à une taille d'environ 17 kb) a été isolé. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC900. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 20.

6.8. Isolement du fragment BamHI-SstI de 1.5 kb issu du cosmide pIBV3.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV3, contenant le gène snaA codant pour la grande sous-unité de la PIIA synthase, il est possible de sous-cloner un fragment d'ADN situé en amont pour l'étudier et le séquencer.

5 Environ 10 µg du cosmide pIBV3 ont été coupés successivement par les enzymes de restriction SstI et BamHI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 % et le fragment BamHI-SstI de 1,5 kb a été isolé par la technique du kit "Geneclean" commercialisé par la société Bio101-Ozyme.

10 Environ 100 ng du plasmide pDH5 (Hilleman et al 1991) coupés par BamHI et SstI ont été ligués avec 200 ng du fragment BamHI-SstI, dans les conditions décrites dans l'exemple 3.3.

Après transformation de la souche TG1 et sélection des transformants sur LB solide + 150 µg/ml d'ampicilline + X-gal, selon la technique décrite par Maniatis et al. (1989), un clone portant le fragment souhaité a été isolé. Le plasmide
15 recombinant a été nommé pVRC1000. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 21.

6.9. Isolement du fragment BamHI-BamHI de 4 kb contenant le gène de structure de la FMN réductase.

Cet exemple décrit comment à partir du cosmide pIBV4, contenant le gène de
20 structure de la FMN réductase (snaC), il est possible de sous-cloner un fragment d'ADN de taille inférieure, contenant ce gène.

Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit plus haut.

Environ 10 µg du cosmide pIBV4 ont été coupés par l'enzyme de restriction BamHI. Les fragments de restrictions ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose
25 0.8 % et le fragment BamHI-BamHI de 4 kb a été isolé par électroélution.

Environ 100 ng de pUC19 coupés par BamHI ont été ligués avec 200 ng du fragment BamHI-BamHI de 4 kb.

Après transformation de la souche E.coli DH5α (supE44 DlacU169 (f80)lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) (Hanahan, 1983) et
30 sélection des transformants sur LB solide + 150 µg/ml d'ampicilline + X-gal, selon la technique décrite par Maniatis et al. (1989), un clone portant le fragment souhaité a été isolé. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC509. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 22.

EXEMPLE 7 : Séquence des fragments d'ADN isolés contenant les gènes de biosynthèse des Pristinamycines de *S. pristinaespiralis* SP92.

Cet exemple illustre le séquençage de fragments d'ADN portant d'une part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines I et d'autre part des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines de la famille des Pristinamycines II de la souche *S. pristinaespiralis*.

7.1. Séquençage d'un fragment BamHI-XhoI de 5 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant les gènes *snaA* et *snaB* de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

Le fragment BamHI-XhoI fait partie du fragment BamHI-BamHI de 6 kb qui a été cloné dans le phasme pBKS- pour donner le plasmide pXL2045 décrit dans l'exemple 6.3. Des sous-fragments de cet insert BamHI-XhoI de 5 kb ont ensuite été obtenus par digestion enzymatique puis sous-clonés dans les phages M13mp18 ou M13mp19 (Messing et al, 1981) dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage utilisés sont les suivants : EcoRI, PstI, PstI, NruI, EcoRI, NruI, NotI, SalI, SstI, XhoI, SalI et XhoI et sont représentés sur la figure 16.

Ces différents inserts ont été séquencés par la méthode de réaction de terminaison de chaîne en utilisant comme amorce de synthèse le primer universel (Maniatis et al, 1989) ou des oligonucléotides synthétisés (comme il est décrit dans l'exemple 5), et complémentaires d'une séquence de 20 nucléotides de l'insert à séquencer.

Le recouvrement entre ces différents inserts a permis d'établir la séquence nucléotidique totale sur les deux brins du fragment BamHI-XhoI qui comprend 5392 pb (SEQ ID n° 1).

7.2. Séquençage d'une région de 1870 bp du fragment EcoRI-BglII de 5.5 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant le gène *snaA* de *S. pristinaespiralis* SP92 peut être obtenue.

La région de 1870 pb séquencée fait partie du fragment EcoRI-BglII de 5,5 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC402 décrit dans l'exemple 6 (figure 15(A)). Des sous-fragments de l'insert EcoRI-BglII de 5,5 kb ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages M13mp18 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont HindIII, PstI et HindIII et sont représentés sur la figure 15(A).

Le recouvrement entre ces fragments a permis d'établir la séquence totale de la région Sau3A-Sau3A qui comprend 1870 pb (SEQ ID n° 5).

7.3. Séquence d'une région de 1830 pb dans le fragment BglII-BglII de 4.6 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment
5 adjacent à celui qui contient le gène snbA de S. pristinaespiralis SP92 peut être obtenue.

Cette séquence a été réalisée par sous-clonage des fragments BamHI-PstI de 1 kb et PstI-EcoRI de 2,1 kb (figure 15(B)) à partir du pVRC501 (Exemple 6) dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Le site PstI a été traversé par sous-clonage d'un
10 fragment Sau3A-Sau3A de 423 pb chevauchant ce site, puis séquençage. La séquence de 1830 pb ainsi obtenue est représentée sur la (SEQ ID n° 6).

7.4. Séquençage de deux régions de 227 pb et 247 pb du fragment SphI de 6.2 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique de fragments
15 contenant une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II (snbC) de S. pristinaespiralis peut être obtenue.

Les régions de 227 et 247 pb séquencées font parties du fragment SphI de 6.2 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC1105 décrit dans l'exemple 6.4. (figure 17). Des sous-fragments de l'insert SphI de 6.2 kb
20 ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages M13mp18 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont XhoI, PstI et BglII et sont représentés sur la figure 17. Le fragment PstI-BglII de 227 pb a été entièrement séquencé, et 247 pb ont été séquencées à partir du fragment XhoI de 900 pb : ces séquences sont présentées sur les SEQ ID n° 11 et 12.

25 7.5. Séquençage de deux régions de 192 pb et 474 pb du fragment SphI de 8.4 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique de fragments contenant des parties du gène de structure de la Pristinamycine I Synthase III (snbD) de S. pristinaespiralis peut être obtenue.

30 Les régions de 192 et 474 pb séquencées font parties du fragment SphI de 8,4 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC1106 décrit dans l'exemple 6.5. (figure 18). Des sous-fragments de l'insert SphI de 8,4 kb ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages

M13mp18 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont XhoI, PstI, SphI et BglII et sont représentés sur la figure 18.

Les fragment BglII-SphI de 192 pb et PstI-XhoI de 474 pb ont été entièrement séquencés : ces séquences sont présentées sur les SEQ ID n° 13 et 14.

5 7.6. Séquençage de deux régions de 485 pb et 291 pb du fragment SphI de 6.6 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique de fragments contenant des parties du gène de structure de la Pristinamycine I synthase IV (snbE) de S. pristinaespiralis peut être obtenue.

10 Les régions de 291 et 485 pb séquencées font parties du fragment SphI de 6.6 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC1104 décrit dans l'exemple 6.6 (figure 19). Des sous-fragments de l'insert SphI de 6.6 kb ont été obtenus par coupure enzymatique puis sous-clonés dans des phages M13mp18 ou M13mp19 dans les deux orientations. Les sites de sous-clonage sont
15 XhoI, PstI et SphI et sont représentés sur la figure 19. Le fragment XhoI-SphI de 485 pb a été entièrement séquencé, et 291 pb ont été séquencées à partir du fragment PstI de 1500 pb : ces séquences sont présentées sur les SEQ ID n° 15 et 16.

7.7. Séquence d'une région de 645 pb dans un fragment XhoI-XhoI de 3.4 kb isolé de pVRC900.

20 Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment situé en amont de celui qui contient le gène snbA de S. pristinaespiralis peut être obtenue.

Pour réaliser cette séquence, un fragment XhoI-XhoI de 3,4 kb a été préalablement sous-cloné dans le vecteur pUC18, à partir du vecteur pVRC900 décrit en 6.7. Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit en
25 6.1.: le plasmide pVRC900 a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI et les fragments ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 %. Le Fragment XhoI-XhoI de 3,4 kb a été purifié par électroélution et a été ligué avec du pUC18 coupé par l'enzyme de restriction SallI. Après transformation dans TG1, un clone portant le fragment XhoI-XhoI de 3,4 kb a été isolé. Le plasmide recombinant a été appelé
30 pVRC903. Sa carte de restriction est présentée figure 23.

La séquence de 645 pb a été ensuite réalisée par sous-clonage des fragments PvuII-EcoRI de 1,4 kb et PvuII-EcoRI de 0.9 kb (figure 23) à partir du pVRC903 décrit ci-dessus, dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Pour réaliser ces clonages, les vecteurs M13mp18 et M13mp19 ont été digérés en premier lieu par

l'enzyme de restriction BamHI; les extrémités cohésives ainsi libérées ont été remplies par le grand fragment de la DNA polymérase I (Klenow : New england Biolabs), selon la technique décrite par Maniatis et al. (1989), de manière à générer des extrémités franches compatibles avec les extrémités libérées par la digestion

5 PvuII; les vecteurs ont été ensuite digérés par l'enzyme de restriction EcoRI. Le site PvuII a été traversé par sous-clonage d'un fragment PstI-PstI de 2,2 kb, isolé du pVRC903, chevauchant ce site. La séquence de 645 pb ainsi obtenue est représentée sur la SEQ ID n° 9.

10 7.8. Séquence d'une région de 1050 pb dans un fragment PstI-PstI de 4.1 kb isolé de pVRC900.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment situé en amont de celui qui contient le gène snbA de S. pristinaespiralis peut être obtenue.

Pour réaliser cette séquence, un fragment PstI-PstI de 4,1 kb a été préalablement sous-cloné dans le vecteur pUC19, à partir du vecteur pVRC900

15 décrit en 6-7. Les différentes étapes de clonage ont été réalisées comme décrit en 6-1. Le plasmide pVRC900 a été digéré par l'enzyme de restriction PstI et les fragments ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.8 %. Le Fragment PstI-PstI de 4,1 kb a été purifié par électroélution et a été ligué avec du pUC19 coupé par l'enzyme de restriction PstI. Après transformation dans TG1, un clone portant le

20 fragment PstI-PstI de 4,1 kb a été isolé. Le plasmide recombinant a été appelé pVRC409. Sa carte de restriction est présentée figure 24.

Cette séquence a été ensuite réalisée par sous-clonage des fragments XhoI-XhoI de 0.7 kb et XhoI-SstI de 1 kb (figure 24) à partir du pVRC409 décrit ci-dessus, dans les vecteurs M13mp18 et M13mp19. Le site XhoI interne à la

25 séquence a été traversé par séquençage sur double brin à partir du plasmide pVRC409. La séquence de 1050 pb ainsi obtenue est représentée sur la SEQ ID n° 10.

7.9. Séquence d'une région de 640 pb dans le fragment BamHI-SstI de 1.5 kb.

Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment

30 adjacent à celui qui contient les gènes snaA et snaB de S. pristinaespiralis codant pour les deux sous-unités de la PIIA synthase peut être obtenue.

Cette séquence a été réalisée par sous-clonage du fragment BamHI-SstI de 1.5 kb (figure 21) à partir du pVRC1000 (Exemple 6.8) dans les vecteurs M13mp18

et M13mp19 (cf exemple 7.1). La séquence de 640 pb obtenue est représentée sur la SEQ ID n° 8.

7.10. Séquençage de la région XhoI-KpnI de 694 bp présente dans le fragment BamHI-BamHI de 4 kb.

5 Cet exemple illustre comment la séquence nucléotidique d'un fragment contenant le gène *snaC* de *S. pristinaespiralis* peut être obtenue.

La région de 694 pb séquencée fait partie du fragment BamHI-BamHI de 4 kb qui a été cloné dans le plasmide pUC19 pour donner le plasmide pVRC509 décrit dans l'exemple 6.9. Un fragment XhoI-KpnI de 694 pb, obtenu par double digestion
10 du plasmide pVRC509 avec les enzymes de restriction XhoI et KpnI et hybridant avec les 3 sondes oligonucléotidiques décrites en 5.6., a été cloné dans les phages M13mp18 et M13mp19. Les sites de sous-clonage XhoI et KpnI sont représentés sur la figure 22.

La séquence du fragment de 694 pb ainsi obtenue est présentée SEQ ID n° 7.

15 **EXEMPLE 8: Analyse des séquences nucléotidiques par détermination des phases ouvertes.**

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes dans les séquences nucléotidiques définies à l'exemple 7, et d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des
20 Pristinamycines II de *S. pristinaespiralis* SP92 ainsi que les polypeptides codés par ces gènes.

8.1. Fragment BamHI-XhoI de 5 kb (pXL2045).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb précédemment isolé et
25 séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

Nous avons recherché la présence de phases ouvertes de lecture au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb en utilisant le fait que l'ADN des Streptomyces présente un haut pourcentage en bases G et C ainsi qu'un fort biais dans l'usage des codons qui composent les phases codantes (Bibb *et al.* 1984). La méthode de Staden et McLachlan (1982) permet de calculer la probabilité des phases codantes en
30 fonction de l'usage des codons de gènes de Streptomyces déjà séquencés et rassemblés dans un fichier contenant 19673 codons obtenu à partir du serveur informatique BISANCE (Dessen *et al.* 1990).

Cette méthode a permis de caractériser au sein du fragment BamHI-XhoI de 5 kb, quatre phases ouvertes de lecture fortement probables qui sont représentées dans le tableau suivant. Elles sont nommées phases 1 à 4 d'après leur position à partir du site BamHI. Pour chacune, on a indiqué leur longueur en bases, leur position au sein du fragment (le site BamHI étant situé à la position 1) ainsi que le poids moléculaire en kDa de la protéine correspondante. Les phases 1, 3 et 4 sont codées par le même brin et la phase 2 par le brin complémentaire (figure 16).

Numéro de la phase et nom du gène	Position	nombre de nucléotides	nombre d'acides aminés	PM en kDa de la protéine codée
1 (<u>snaA</u>)	48-1313	1266	422	46.5
2	2530-1328	1203	401	-
3 (<u>snaB</u>)	(inv) 2692-	831	277	29
4 (<u>samS</u>)	3522 3558-4763	1206	402	43

- Les phases 1 et 3 correspondent respectivement aux protéines SnaA (SEQ ID n° 2) et SnaB (SEQ ID n° 3) précédemment isolées comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage des gènes est détaillé dans l'exemple 6. En effet les séquences NH₂-terminales des produits des ORFs 1 et 3 sont identiques aux séquences NH₂-terminales trouvées pour les protéines SnaA et SnaB respectivement, à l'exemple 5.1.2, sauf pour la méthionine amino-terminale qui a été excisée. Par ailleurs, les masses moléculaires calculées d'après les séquences sont comparables aux masses moléculaires apparentes des protéines SnaA et SnaB, estimées respectivement en PAGE-SDS comme il est décrit dans l'exemple 5.

- La comparaison du produit de la phase ouverte n° 4 avec les séquences protéiques contenues dans la banque NBRF fait apparaître une homologie avec différentes S-adenosylmethionine (ou SAM) synthases, notamment de E.coli (Markham *et al.*, 1984), de rat (Horikawa *et al.*, 1989) et de S.cerevisiae (Thomas *et al.*, 1988). Les pourcentages d'homologie calculés sur la totalité de la séquence à l'aide de l'algorithme de Kanehisa (1984) varient de 51,8 à 55,4 %.

Ces comparaisons de séquences permettent donc de mettre en évidence que le produit de la phase ouverte n° 4 est une SAM synthase, impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines I ou II. Ce gène a été désigné samS (SEQ ID n° 4).

La mise en évidence de l'implication du gène samS dans la biosynthèse des Pristinamycines est confirmée par la construction du mutant SP92 disrupté dans ce gène, comme décrit dans l'exemple 9.2.

- La comparaison de la séquence du produit de la phase ouverte n° 2 avec les séquences protéiques contenues dans la banque Genpro, fait apparaître qu'une partie interne de cette protéine est homologue à 36 % avec une partie interne de la première phase ouverte de la séquence d'insertion (IS891) d'Anabaena (Bancroft et Wolk, 1989). Ce résultat suggère que la phase ouverte n° 2, désignée ORF 401, appartient à une séquence d'insertion, et donc qu'il existe une séquence d'insertion située entre les gènes snaA et snaB.

8. 2. Fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb (pVRC402).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment Sau3A-Sau3A de 1870 pb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment Sau3A-Sau3A a été effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: cette phase s'étend de la position 109 à la position 1858 du fragment Sau3A-Sau3A, ce qui correspond à une phase de 1749 bases codant pour une protéine de 582 acides aminés ayant une masse moléculaire de 61400 Da. Cette protéine correspond à la protéine SnaA précédemment purifiée comme il est décrit dans l'exemple 5 et dont le clonage du gène est détaillé dans l'exemple 6. En effet la séquence NH₂-terminale du produit de l'ORF présente sur le fragment Sau3A-Sau3A est identique à la séquence NH₂-terminale trouvée pour la protéine SnaA, à l'exemple 5.2. La masse moléculaire de 61400 Da calculée d'après la séquence est comparable à la masse moléculaire apparente de la protéine SnaA, estimée à 67000 Da en PAGE-SDS et à 60000 Da par perméation sur gel comme il est décrit dans l'exemple 5.2.1.B.

Le gène snaA code donc pour l'enzyme qui catalyse la formation de l'acyladenylate 3-hydroxypicolinyl-AMP à partir d'une molécule d'acide 3-hydroxypicolinique et d'une molécule d'ATP: l'acide 3-hydroxypicolinique-AMP ligase (SEQ ID n° 5).

8.3. Fragment de 1830 pb (pVRC501).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment de 1830 pb séquencé à partir du fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb précédemment isolé.

5 La recherche de phases ouvertes pour le fragment de 1830 pb a été effectuée comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: le démarrage probable de cette phase se situe à la position 103 et la fin à la position 1686 de la région de 1830 pb séquencée à partir du fragment BamHI-EcoRI, ce qui correspond à une protéine
10 de 528 acides aminés ayant un poids moléculaire approximatif de 54000.

La comparaison de la séquence de cette protéine avec les séquences contenues dans la banque Genepro fait apparaître qu'elle est homologue à des protéines ayant une fonction de transport pour différents métabolites, notamment pour la tétracycline chez différents microorganismes (Khan et Novick, 1983; Hoshino et al., 1985),
15 l'actinorhodine (Fernandez-Moreno et al., 1991) et la méthylénomycine (Neal et Chater, 1987) chez S. coelicolor.

Ces données indiquent que le produit de la phase ouverte contenue dans le fragment BamHI-EcoRI de 3,1 kb est une protéine de transport permettant d'exporter les Pristinamycines I (et éventuellement les Pristinamycines II) à l'extérieur de la
20 cellule. Cette protéine a été désignée SnbR et le gène correspondant snbR (SEQ ID n° 6).

L'analyse du profil d'hydrophobicité de la protéine SnbR par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) corrobore sa localisation membranaire et donc sa fonction de transport.

8.4. Fragment de 1050 pb (pVRC409).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment de 1050 pb précédemment séquencé à partir du pVRC409, comme il est décrit dans l'exemple 7. 8.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment de 1050 pb a été effectuée
30 comme précédemment. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: cette phase s'étend de la position 84 à la position 962 de la portion séquencée, ce qui correspond à une phase de 878 bases codant pour une protéine de 292 acides aminés ayant une masse moléculaire de 32000 Da. Cette protéine a été appelée protéine PapM. Elle a été par
35 ailleurs purifiée à partir de la souche S. pristinaespiralis SP92 comme il est décrit

dans l'exemple 5. La masse moléculaire de 32000 Da calculée d'après la séquence est identique à la masse moléculaire apparente de 32000 Da estimée sur PAGE-SDS comme il est décrit dans l'exemple 5. Par ailleurs la séquence NH₂-terminale de cette protéine, réalisée comme décrit dans l'exemple 5 correspond bien à la séquence NH₂-terminale de la protéine PapM identifiée par l'analyse des phase ouvertes de la séquence de 1050 pb (SEQ ID n° 10).

8.5. Fragment de 227 pb et de 247pb (pVRC1105).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein des fragments de 227pb et 247 pb séquencés à partir de pVRC1105, comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phase ouverte pour ces deux fragments a été effectuée comme précédemment. Une phase de lecture non complète a pu être mise en évidence dans les deux cas sur toute la longueur du fragment.

La séquence obtenue à partir de la phase ouverte identifiée sur le fragment de 247 pb isolé du fragment XhoI de 900 pb contient une des séquences internes de la protéine SnbC purifiée comme décrit dans l'exemple 5.

La comparaison du produit des phases ouvertes identifiées sur les fragments de 227 pb et 247 pb isolés de pVRC1105 avec les séquences de la banque Genpro fait apparaître qu'elles sont homologues à des peptides synthases. Celle déduite du fragment de 227 pb présente 24.5 % d'homologie avec l' α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthase d'Acremonium chrysogenum (Gutierrez et al. 1991). Celle déduite du fragment de 247 pb présente 34.9 % d'homologie avec la gramicidine S synthase II de Bacillus brevis (Turgay et al. 1992) et 28 % avec l' α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthase d' Acremonium chrysogenum (Gutierrez et al. 1991).

Ceci confirme que le cosmide pIBV3 isolé dans l'exemple 5.1 contient bien une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase II décrite dans l'exemple 5.3, désignée SnbC (SEQ ID n° 11 et 12).

8.6. Fragment de 192 pb et de 474 pb (pVRC1106).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein des fragments de 192 pb et 474 pb séquencés à partir de pVRC1106, comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phase ouverte pour ces deux fragments a été effectuée comme précédemment. Une phase de lecture non complète a pu aussi être mise en évidence sur le fragment de 192 pb isolé de pVRC1106. Ses caractéristiques sont les

suivantes: cette phase démarre à la position 3 de la portion séquencée en direction du site BglII. Aucun codon stop n'a été identifié ce qui indique que cette phase ouverte n'est pas terminée.

La séquence obtenue à partir de la phase ouverte identifiée sur le fragment
5 BglII-SphI de 192 pb contient la séquence interne de la protéine SnbD purifiée comme décrit dans l'exemple 5 qui s'avère en fait être la séquence NH₂-terminale de la protéine.

Une phase de lecture non complète a pu être mise en évidence sur toute la longueur du fragment XhoI-PstI de 474 pb.

10 La comparaison du produit de la phase ouverte identifiée sur le fragment de 474 pb isolé de pVRC1106 avec les séquences de la banque Genpro fait apparaître que ce fragment de protéine présente de 30 à 40 % d'homologie avec des peptides synthèses, par exemple 39.4 % avec la gramicidine S synthase II de Bacillus brevis (Turgay et al. 1992) et et 34 % avec l' α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthase
15 d'Acremonium chrysogenum (Gutierrez et al. 1991).

Ceci confirme que le cosmide pIBV3 isolé dans l'exemple 5.1 contient bien une partie du gène de structure de la Pristinamycine I Synthase III décrite dans l'exemple 5.4, désignée SnbD (SEQ ID n° 13 et 14).

8.7. Fragment de 291 pb et de 485 pb (pVRC1104).

20 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein des fragments de 291 pb et 485 pb séquencés à partir de pVRC1104, comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phase ouverte pour ces deux fragments a été effectuée comme précédemment. Une phase de lecture non complète a pu être mise en évidence dans
25 les deux cas sur toute la longueur du fragment.

La séquence obtenue à partir de la phase ouverte identifiée sur le fragment de 291 isolé à partir du fragment PstI de 1450 pb contient la séquence interne de la protéine SnbE purifiée comme décrit dans l'exemple 5.

La comparaison du produit de la phase ouverte identifiée sur le fragment XhoI-SphI
30 SphI de 485 pb isolé de pVRC1104 avec les séquences de la banque Genpro fait apparaître qu'elle est homologe à des peptides synthèses, par exemple 34.7 % avec la gramicidine S synthase II de Bacillus brevis (Turgay et al. 1992) et et 36.2 % avec l' α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthase d'Acremonium chrysogenum (Gutierrez et al. 1991).

Ceci confirme que le cosmide pIBV3 isolé dans l'exemple 5.1 contient bien une partie du gène de structure de la Pristinamycine I synthase IV décrite dans l'exemple 5.5, désignée SnbE (SEQ ID 15 et 16).

8.8. Fragment de 645 pb (pVRC903).

5 Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment de 645 pb précédemment séquencé à partir du plasmide pVRC903, comme il est décrit dans l'exemple 6.7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment de 645 pb a été effectuée comme précédemment. Une phase ouverte de lecture non complète a pu ainsi être
10 mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes: cette phase présente deux possibilités de démarrage de traduction, un GTG à la position 61, un GTG à la position 70 de la portion séquencée (l'ATG situé en position 124 n'a pas été pris en compte en raison des homologies de séquences décrites plus loin). L'analyse des probabilités de présence des régions Shine-Dalgarno ne permet pas de distinguer
15 lequel de ces codons correspond au démarrage. Aucun codon stop n'a été identifié, ce qui indique que cette phase ouverte n'est pas terminée. Le gène dont une partie a été identifiée a été appelé papA et la protéine correspondante a été appelée protéine PapA (SEQ ID n° 9).

La comparaison du produit de la phase ouverte identifiée dans le fragment
20 XhoI-XhoI de 3,4 kb isolé de pVRC900, avec les séquences contenues dans la banque Genpro fait apparaître qu'elle est homologue aux composants II des protéines de type p-aminobenzoate synthase et anthranilate synthase, impliquées respectivement dans la synthèse de l'acide p-aminobenzoïque (précurseur de l'acide folique) et dans la synthèse de l'acide anthranilique (précurseur du tryptophane) de différents
25 microorganismes. Elle présente notamment une homologie de 48 % avec la protéine TrpG de Azospirillum (Zimmer et al 1991) et une homologie de 47 % avec la protéine PabA de *Klebsiella pneumoniae* (Kaplan et al 1985). Les protéines TrpG et PabA portent l'activité glutaminase impliquée dans la transamination de l'acide chorismique. Les homologies mises en évidence tendent à montrer que la protéine
30 PapA serait elle aussi impliquée dans l'activité de transamination de l'acide chorismique. L'acide chorismique est proposé comme étant un précurseur de la p-diméthylamino phénylalanine, composant des Pristinamycines I, par analogie à la synthèse du chloramphénicol, antibiotique produit par des *Streptomyces* (Sharka et al 1970).

Le rôle de la protéine PapA est démontré ultérieurement (exemple 9.3.) par l'analyse de mutants de la souche SP92, dans le gène papA.

8.9. Fragment BamHI-SstI de 1.5 kb (pVRC1000).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment BamHI-SstI de 1,5 kb précédemment isolé et séquencé comme il est décrit dans les exemples 6.8 et 7.9.

La recherche de phases ouvertes pour la région séquencée de 640 pb présente dans le fragment BamHI-SstI de 1,5 kb a été effectuée comme il est décrit dans l'exemple 8.1. Une seule phase ouverte de lecture complète a pu ainsi être mise en évidence. Aucun démarrage et aucune fin de traduction n'ont pu être mis évidence, ce qui indique que la région de 640 pb séquencée est probablement interne à une phase de lecture beaucoup plus grande, désignée snbD (SEQ ID n° 8).

La comparaison de la séquence de la protéine codée par la région de 640 pb avec les séquences protéiques contenues dans les banques Genpro et NBRF fait apparaître que cette protéine est homologue à 20-25 % à une partie interne des peptide-synthases telles que la gramicidine synthase I de B. brevis (Hori et al. 1989), de la tyrocidine synthase I de B. brevis (Weckermann et al 1988), et l'ACV synthase d'Acremonium chrysogenum (Gutierrez et al. 1991).

Ces données indiquent que la protéine codée en partie par la région de 640 pb est probablement une peptide synthase impliquée dans la biosynthèse de la partie peptidique des Pristinamycines II: en effet toutes les peptides synthases impliquées dans la biosynthèse des Pristinamycines I ont déjà été identifiées dans d'autres régions du chromosome de S. pristinaespiralis comme il est décrit dans les exemples 5.2., 5.3., 5.4. et 5.5.

8.10. Fragment de 694 pb (pVRC509).

Cet exemple illustre comment il est possible de déterminer les phases ouvertes de lecture présentes au sein du fragment de 694 pb précédemment séquencé à partir du pVRC509, comme il est décrit dans les exemples 6 et 7.

La recherche de phases ouvertes pour le fragment de 694 pb a été effectuée comme précédemment. Une phase ouverte de lecture non complète a pu ainsi être mise en évidence. Ses caractéristiques sont les suivantes : cette phase démarre à la position 210, de la portion séquencée. Aucun codon stop n'a été identifié, ce qui indique que cette phase ouverte n'est pas terminée. La masse moléculaire de la protéine correspondante ne peut donc pas être calculée et comparée à la masse

moléculaire apparente de 28000 Da de la FMN réductase, estimée sur PAGE-SDS comme il est décrit dans l'exemple 5.6. Par contre la séquence NH₂-terminale de la protéine ainsi identifiée par l'analyse des phase ouvertes de la séquence de 694 pb, est identique à la séquence NH₂-terminale de la protéine SnaC purifiée comme décrit dans l'exemple 5. De même, on retrouve dans la protéine déduite de la portion séquencée, les deux séquences protéiques internes de la FMN réductase décrite en 5.6. Ceci confirme que le gène isolé à partir du cosmide pIBV4 correspond bien à la protéine FMN réductase décrite dans l'exemple 5.6, désignée SnaC (SEQ ID n° 7).

L'étude des fragments d'ADN de la souche *S. pristinaespiralis* SP92, portés par les cosmides pIBV1 à pIBV4, a mis en évidence la présence de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I. Les gènes snaA, snaB et samS codent pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines II, la Pristinamycine IIA synthase et une probable SAM synthase et sont groupés physiquement sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmide pIBV1. De même les gènes snbA, snbR, papA et papM -qui codent pour des protéines intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines I, l'acide 3-hydroxy-picolinique-AMP ligase (SnbA), la protéine SnbR probablement responsable du transport des Pristinamycines I, la protéine PapA impliquée dans la biosynthèse, à partir de l'acide chorismique, de la p-aminophénylalanine, et la p-aminophénylalanine (phényl-N)-méthyltransférase (PapM)- sont groupés sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmide pIBV2. De même, les gènes snaA et snaD d'une part -qui codent pour des protéines intervenant dans la biosynthèse des Pristinamycines II, la protéine SnaD étant probablement une peptide synthase- et les gènes snbC, snbD et snbE d'autre part -qui codent pour les 3 peptide synthases SnbC, SnbD et SnbE, impliquées dans la formation de la chaîne peptidique de la Pristinamycine I à partir de ses 6 acides aminés séparés- sont groupés sur un large fragment d'ADN cloné dans le cosmide pIBV3. Ces résultats confirment l'hypothèse du groupement des gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et également des gènes de biosynthèse des Pristinamycines I et offrent la possibilité de cloner les autres gènes impliqués dans ces biosynthèses, par marche sur le chromosome, en amont et en aval des régions étudiées.

De plus, il est possible par hybridation de l'ADN total des différentes souches productrices de Streptogramines (cf tableau 1) avec les gènes snaA, snaB, snaC, snaD, samS, snbA, snbR, snbC, snbD, snbE, papA et papM ou avec les gènes identifiés par marche sur le chromosome, ou avec des fragments de ceux-ci, d'isoler

les gènes correspondants aux mêmes fonctions dans les autres microorganismes producteurs de Streptogramines. Ceci permet par la même démarche que celle envisagée pour les Pristinamycines, d'isoler l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse des différentes Streptogramines.

5 **EXEMPLE 9 : Etude génétique de fragments d'ADN par disruption de gènes.**

10 Cet exemple illustre comment il est possible de mettre en évidence l'implication de gènes dans la biosynthèse des Streptogramines en construisant des souches dérivées d'une souche productrice, mutées au niveau de ces gènes par disruption et en analysant le phénotype de tels mutants. Cet exemple montre de plus comment obtenir des souches ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants A et B des Streptogramines, ou produisant des composants A ou B avec des ratios différents de ceux que l'on observe avec la souche SP92.

15 9.1. Construction d'un mutant de *S. pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène *snaA*.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène *snaA*, de construire une souche de *S. pristinaespiralis* SP92 qui ne produit plus de Pristinamycine IIA et qui produit par contre de la Pristinamycine IIB.

20 Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonctionnalité de la protéine SnaA et de fournir un intermédiaire de production de la Pristinamycine II, pouvant par la suite être modifié.

Sa construction a été réalisée à l'aide d'un vecteur suicide, capable de se répliquer chez *E. coli* seulement, mais portant un marqueur de résistance s'exprimant chez *Streptomyces*. Ce vecteur, pDH5, a été développé par Hillemann *et al.* (1991).

25 9.1.1. Construction du plasmide pVRC505.

Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez *S. pristinaespiralis* SP92 et qui peut être utilisé pour disrupter par simple recombinaison homologue le gène *snaA*.

30 Le plasmide pVRC505 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène *snaA* à partir du plasmide pXL2045 décrit dans l'exemple 6.3.

Le fragment *Bam*HI de 6 kb, cloné dans le pXL2045 (figure 16), a été coupé par les enzymes de restriction *Eco*RI et *Pst*I. Après séparation des fragments ainsi

généérés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, un fragment de 0,7 kb, contenant l'extrémité 5' du gène snaA, a été isolé et purifié par GeneClean (Bio101, La Jolla, Californie).

100 ng de vecteur pDH5 linéarisés par une double digestion EcoRI, PstI, ont
5 été ligués avec 100 ng du fragment de 0,7 kb, comme décrit dans l'exemple 3.3. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC505. Le plasmide pVRC505 a été préparé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 25.

10 9.1.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène snaA par recombinaison homologue.

Cet exemple illustre comment le mutant de S. pristinaespiralis SP92, disrupté dans le gène snaA, a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide
15 suicide pVRC505.

La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit dans D. Hopwood et al. (1985).

La souche SP92 a été cultivée en milieu YEME, 34 % de sucrose, 5 mM MgCl₂, glycine 0.25 % pendant 40 heures à 30°C. Le mycélium a été protoplastisé
20 en présence de lysozyme et 5X1 µg de pVRC505 ont été utilisés pour la transformation (par la méthode utilisant le PEG) des protoplastes. Après une nuit de régénération des protoplastes sur milieu R2YE (D. Hopwood et al. 1985), les recombinants ont été sélectionnés par étalement de 3 ml de milieu SNA (D. Hopwood et al. 1985) contenant 2.6 µg/ml de thiostrepton.

25 Sur les 5 transformations réalisées, 3 clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants inférieur à 1 par µg d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène snaA porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 0,7 kb du plasmide suicide pVRC505. La faible taille du fragment inséré dans pVRC505,
30 0,7 kb, explique le faible taux de recombinaison.

Les spores des recombinants ont été isolées par étalement et croissance sur milieu R2YE supplémenté par 400 µg/ml de thiostrepton, et rééталées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées.

Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC505, différents
35 Southernns de l'ADN total de plusieurs clones recombinants digéré par les enzymes de

restriction appropriées, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment de 0,7 kb, utilisés successivement comme sondes après marquage par random priming (Random Primed DNA labeling kit, Boehringer Mannheim, France) avec du [α - 32 P]dCTP, comme décrit dans Maniatis *et al.* (1989). Les résultats d'hybridation montrent l'apparition, dans le génome des clones recombinants, d'une bande EcoRI-PstI supplémentaire, de la taille du vecteur pDH5 et hybridant avec celui-ci ainsi que d'une bande supplémentaire EcoRI-EcoRI, hybridant à la fois avec les 2 sondes. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC505. Ce mutant correspond bien à l'intégration par simple recombinaison homologue du plasmide pVRC505 dans le gène snaA.

9.1.3. Production de Pristinamycines par le mutant SP92::pVRC505.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de *S. pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène snaA par l'intégration du plasmide pVRC505, ne produit plus de Pristinamycine IIA, tout en continuant à produire de la Pristinamycine IIB.

Le mutant SP92::pVRC505, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée comme suit : 0.5 ml d'une suspension de spores des souches citées sont ajoutés en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl, 0.2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1.25 g/l de CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6.9 par de la soude avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 heures à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. 2.5 ml de la culture précédente âgée de 44 heures sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7.5 g/l d'amidon, 22.5 g/l de glucose, 3.5 g/l de levure fourragère, 0.5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6,0 par de l'acide chlorhydrique avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 24, 28 et 32 heures à 27°C. A chaque temps, 10 g de moût sont pesés dans un erlen lisse, auxquels sont ajoutés 20 ml de phase mobile composée de 62.5 % d'acétonitrile et 37.5 % d'une solution de 0.1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH 3,0 par H_3PO_4) et permettant l'extraction des Pristinamycines. Après agitation sur un agitateur (325 rpm) pendant 20 min à température ambiante, le tout est filtré sur filtre de

papier et les Pristinamycines sont dosées par CLHP comme décrit à l'exemple 5.1.1.A.

Les résultats ont montré que, dans les conditions de fermentation réalisées, le mutant SP92::pVRC505 a produit une quantité de Pristinamycine I équivalente à celle du témoin SP92, ceci pour les 3 temps testés. En revanche, alors que le témoin a produit à 24, 28 et 32 heures de fermentation, environ 70 % de Pristinamycine IIA et 30 % de Pristinamycine IIB, le mutant SP92 :: pVRC505 a produit pour ces mêmes temps, 100 % de Pristinamycine IIB, en quantités équivalentes à la somme des Pristinamycine IIA + Pristinamycine IIB produites par la souche SP92. Le mutant est donc bien bloqué dans une étape de biosynthèse de la Pristinamycine II qui correspond à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ce mutant accumule donc la Pristinamycine IIB. Ceci montre bien l'implication fonctionnelle du gène snaA dans la conversion Pristinamycine IIB en Pristinamycine IIA.

Cet exemple montre qu'il est possible, à partir des gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines. Ceci a été montré pour les Pristinamycines II mais les mêmes résultats peuvent être obtenus pour les Pristinamycines I et par extension, pour les différents composants des Streptogramines. Des souches produisant différents intermédiaires peuvent être ainsi obtenues. Ces souches peuvent être utilisées pour produire des molécules nouvelles, par modification(s) chimique(s), biochimique(s), enzymatique(s), etc. des dits intermédiaires. Un blocage dans une étape précoce de la voie de biosynthèse de l'un ou l'autre des composants des Streptogramines peut également conduire à des souches mutées ne produisant plus que l'un ou l'autre des composants.

25 9.2. Construction d'un mutant de *S. pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène samS.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène samS de construire une souche de *S. pristinaespiralis* SP92 qui produit 35 % de moins de PIA et environ 10 fois plus de PIB (les structures chimiques sont représentées sur la figure 2) par rapport à la souche sauvage SP92. Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonction de SAM synthase présumée pour la protéine codée par le gène samS et d'obtenir une souche synthétisant plus de PIB que la souche sauvage SP92.

9.2.1. Construction du plasmide pVRC702.

A partir du plasmide pXL2045 (décrit dans l'exemple 6.3.), on a isolé par coupure enzymatique le fragment BamH1-EcoR1 de 3,2 kb que l'on a purifié après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % par la méthode du kit Geneclean (voir exemple 6.8). Ce fragment porte le gène snaB ainsi que le gène samS (figure 16). Ce fragment a été ensuite cloné dans un plasmide pUC18 de la façon suivante: 50 ng de pUC 18 ont été linéarisés par la double digestion à l'aide des enzymes EcoR1 et BamH1 puis ligués en présence de T4 DNA ligase (Biolabs) avec 300 ng du fragment BamH1-EcoR1 de 3,2 kb. Après transformation de cellules compétentes de la souche E. coli TG1 avec ce mélange de ligation, on a pu isoler un clone recombinant possédant le plasmide pUC18 avec l'insert de 3,2 kb que l'on a nommé pVRC701 (figure 26).

Le plasmide pVRC702 dérive du plasmide pVRC701 par l'introduction entre les deux sites Sst1 situés au milieu du gène samS (figure 27) d'une cassette portant le gène amR codant pour la résistance à l'apramycine et à la géniticine. Pour cela, un fragment BamH1-BamH1 de 2,2 kb portant la cassette Ω amR a d'abord été isolé par digestion BamH1 du plasmide pHP45 Ω amR (donné par J.L. Pernodet, Laboratoire de Génétique d'Orsay) en utilisant la même technique que précédemment. 200 ng de ce fragment ont ensuite été ligués avec 50 ng du plasmide pUC1318 (Kay et McPherson, 1987) linéarisés par l'enzyme BamH1 et ce mélange de ligation a été introduit dans des cellules compétentes E. coli TG1. A partir du clone recombinant possédant le plasmide pUC1318 contenant la cassette Ω amR, on a pu réisoler par coupure partielle à l'aide de l'enzyme Sst1, 50 ng d'un fragment Sst1-Sst1 de 2,2 kb contenant la cassette Ω amR que l'on a ligué avec 30 ng du plasmide pVRC701 coupé par Sst1 (figure 26) pour donner après transformation de cellules compétentes E. coli TG1, le plasmide PVRC 702 dont la structure est détaillée sur la figure 27.

Le plasmide pVRC702 ainsi obtenu a été préparé en larges quantités selon la méthode précédemment décrite dans l'exemple 2.1.

9.2.2. Construction de la souche ayant le gène chromosomique samS:: Ω amR.

Cette souche a été obtenue par transformation de protoplastes de S. pristinaespiralis avec 1 μ g du plasmide suicide pVRC702 ne pouvant pas se répliquer dans une cellule de Streptomyces. Les protocoles de préparation des protoplastes et de transformation sont les mêmes que ci-dessus (exemple 9.1). Les seules modifications apportées par rapport à l'exemple 9.1 concernent l'antibiotique

de sélection. Dans le cas présent, les protoplastes recombinants après une régénération de 18 heures à 30°C sur milieu R2YE sont sélectionnés en présence de 50 µg/ml final de généticine (Sigma Chemical Co.). Ainsi à chaque boîte de R2YE, on ajoute une surcouche composée de 3ml de SNA contenant 383 µg/ml de généticine.

On a ainsi pu isoler 500 clones recombinants résistants à la généticine qui peuvent résulter soit d'une intégration dans le chromosome du plasmide pVRC702 à la suite d'une recombinaison homologue simple entre les gènes chromosomique et plasmidique samS (cas de simple crossing-over), soit d'un échange entre le gène chromosomique samS et le gène plasmidique samS::ΩamR à la suite d'un double événement de recombinaison homologue (cas de double crossing-over). Dans ces deux cas de figure, la cassette ΩamR se trouve transférée sur le chromosome de la souche et lui confère une résistance amR stable au cours des générations.

Les clones recombinants ont été isolés par étalement et croissance sur milieu R2YE contenant 50 µg/ml final de généticine puis analysés par la technique d'hybridation sur colonies. L'hybridation des clones avec une première sonde obtenue comme il est décrit dans l'exemple 9.1 à partir du fragment BamHI-EcoRI de 2,7 kb issu de pVRC702 et correspondant au pUC18 ainsi qu'avec une deuxième sonde correspondant au fragment BamHI de 2,2 kb portant la cassette ΩamR, a permis de distinguer les cas de simple crossing-over (hybridant avec les deux sondes) des cas de double crossing-over (n'hybridant qu'avec la deuxième sonde). Les 3 clones résultant d'un double crossing-over ainsi sélectionnés ont été purifiés par étalement et croissance sur milieu R2YE contenant 50 µg/ml final de généticine et des stocks de spores ont été obtenus.

Afin de vérifier la structure génomique des 3 doubles recombinants, différents Southern de l'ADN chromosomique de ces clones digéré par les enzymes EcoRI et BamHI ont été réalisés et hybridés avec les trois sondes suivantes : la sonde correspondant à la cassette ΩamR obtenue à partir du fragment BamHI de 2,2 kb de pVRC702, la sonde correspondant à pUC18 obtenue à partir du fragment BamHI-EcoRI de 2,7 kb de pVRC701 et enfin une sonde obtenue à partir du fragment EcoRI-SstI de 1,3 kb de pVRC701 portant le gène snaB et le début de samS. Ces hybridations ont permis de vérifier que les trois clones testés résultaient bien d'un double événement de recombinaison homologue ayant permis le remplacement du gène chromosomique intact samS par le gène muté samS interrompu par la cassette ΩamR.

Un de ces trois clones mutants a été nommé SP92 samS::QamR.

9.2.3. Production de pristinamycines par la souche mutante samS::QamR.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant SP92 samS::QamR ayant le gène samS disrupté produit 35 % de moins de Pristinamycine IA et 10 fois plus de Pristinamycine IB que la souche sauvage SP92.

Le mutant SP92 samS::QamR ainsi que la souche témoin SP92 ont été cultivées en milieu de production liquide et leurs productions de Pristinamycine II et de Pristinamycine I dosées comme décrit dans l'exemple 9.1.

Les résultats ont montré que, dans les conditions de fermentation réalisées, le mutant SP92 samS::QamR produit une quantité de Pristinamycines II équivalente à celle du témoin SP92 pour les trois temps testés. En revanche, le mutant SP92 samS::QamR produit aux trois temps testés environ 35 % de moins de Pristinamycine IA et 10 fois plus de Pristinamycine IB que la souche témoin. La forme IB des Pristinamycines représente ainsi 20 % de l'ensemble des Pristinamycines du type I totales produites par le mutant SP92 samS::QamR alors que la souche témoin ne synthétise que de l'ordre de 1 % de PIB. La forme IB des Pristinamycines diffère de la forme IA par le fait que le cinquième résidu est la p-méthylaminophénylalanine au lieu de la p-diméthylaminophénylalanine pour la Pristinamycine IA. Le fait que le mutant SP92 samS::QamR produise plus de Pristinamycine IB et moins de Pristinamycine IA montre que la disruption du gène samS provoque une diminution du degré de méthylation du cinquième résidu des Pristinamycines I et donc que le gène samS est probablement impliqué dans la biosynthèse du donneur de méthyle la SAM c'est-à-dire qu'il code pour une SAM synthase.

25 9.3. Construction d'un mutant de *S. pristinaespiralis* SP92 disrupté dans le gène papA.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène papA, de construire une souche de *S. pristinaespiralis* SP92 qui ne produit plus de PI. Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonctionnalité de la protéine PapA. Sa construction a été réalisée à l'aide du vecteur suicide, pDH5, décrit dans l'exemple 9.1.

9.3.1. Construction du plasmide pVRC508.

Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez *S. pristinaespiralis* SP92, qui peut être utilisé pour disrupter par simple recombinaison homologue le gène *papA*.

Le plasmide pVRC508 a été construit pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène *papA*, à partir du plasmide pVRC903, décrit dans l'exemple 7.7.

Dans l'exemple 7.7., il a été décrit le clonage du fragment *PvuII-EcoRI* de 1,4 kb dans M13mp18 à partir du plasmide pVRC903, en vue du séquençage du gène *papA* (ce fragment correspond au fragment *PvuII-XhoI* de 1,4 kb présenté dans le vecteur pVRC903, figure 23).

Cette construction dans M13mp18 a été digérée par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*. Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % du vecteur M13mp18 et du fragment de 1,4 kb, contenant une partie du gène *papA*, celui ci a été isolé et purifié par Geneclean (Bio101, La Jolla, Californie). La localisation du fragment dans le gène *papA* est présentée figure 23 .

100 ng de vecteur pDH5 linéarisés par une double digestion avec les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*, ont été ligués avec 200 ng du fragment de 1,4 kb, comme décrit dans l'exemple 3.3. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC508. Le plasmide pVRC508 a été préparé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 28.

9.3.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène *papA* par recombinaison homologue.

Cet exemple illustre comment le mutant de *S. pristinaespiralis* SP92, disrupté dans le gène *papA*, a été construit. Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC508. La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 9.1. Après transformation des protoplastes de la souche SP92, les recombinants ont été sélectionnés par étalement de 3 ml de milieu SNA contenant 2.6 mg/ml de thiostrepton. Sur les 5 transformations réalisées avec 5 fois 1 µg du plasmide pVRC508, une dizaine de clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants d'environ 2 par µg d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène *papA* porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 1.4 kb du plasmide suicide pVRC508.

Les spores des recombinants ont été isolées par étalement et croissance sur milieu R2YE contenant 400 µg/ml de thiostrepton, et rééталées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées.

Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC508; différents
5 Southern de l'ADN total de plusieurs clones recombinants, purifiés comme décrit ci-dessus, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment de 1,4 kb utilisés successivement comme sondes après marquage par random priming avec du [α -³²P]dCTP comme décrit dans l'exemple 9.1. Les résultats d'hybridation montrent la disparition, dans le génome des clones recombinants digérés par l'enzyme de
10 restriction EcoRI (site encadrant le fragment de 1,4 kb) de la bande EcoRI de 6,8 kb et l'apparition de deux bandes supplémentaires par rapport à la souche témoin SP92, l'une de 2,4 kb hybridant avec le fragment de 1,4 kb et l'autre de 10,5 kb hybridant à la fois avec pDH5 et avec le fragment de 1,4 kb. La digestion des clones recombinants par l'enzyme de restriction PstI montre l'apparition, de deux bandes
15 supplémentaires par rapport à la souche témoin SP92, l'une de 1,0 kb hybridant avec le fragment de 1,4 kb et l'autre de 5,1 kb hybridant à la fois avec pDH5 et avec le fragment de 1,4 kb. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC508.

9.3.3. Production de Pristinamycines par le mutant SP92::pVRC508.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de
20 S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène papA par l'intégration du plasmide pVRC508, ne produit plus de Pristinamycine I.

Le mutant SP92::pVRC508, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation, ainsi que le dosage des Pristinamycines I et II, ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 9.1.

25 Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, alors que la souche témoin SP92 produit une quantité standard de Pristinamycines I, aucune trace de Pristinamycines de type I n'a été détectée dans le moût de fermentation du mutant SP92::pVRC508. Par ailleurs la production de Pristinamycines II par le mutant SP92::pVRC508 est équivalente à celle du témoin
30 SP92. Le mutant SP92::pVRC508 ne produit donc plus que des Pristinamycines II. Ces résultats montrent bien que le gène papA code pour une protéine impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines I.

Par ailleurs pour s'assurer que la disruption réalisée ne touche que le gène ciblé papA, le mutant SP92::pVRC508 a été fermenté en présence de p-diméthylamino
35 phenylalanine. Le mutant SP92::pVRC508, a été fermenté comme décrit plus haut

avec ajout, à 17 heures de fermentation, de 100 mg/l de p-diméthylamino-phénylalanine. Dans ces conditions de complémentation le mutant SP92::pVRC508 produit une quantité de Pristinamycines I équivalente à celle produite par la souche SP92. La production de Pristinamycines II est équivalente dans les deux souches.

- 5 Ceci nous permet de conclure que le mutant SP92::pVRC508 ne produit pas de Pristinamycines I parce qu'il est bien disrupté dans un gène intervenant dans la biosynthèse de la p-diméthylaminophénylalanine (le gène papA). La complémentation de ce mutant par la p-diméthylaminophénylalanine restaure sa capacité à produire des Pristinamycines I, prouvant que la mutation dans le gène papA n'a pas
10 d'effet polaire sur la synthèse des autres précurseurs des Pristinamycines I ou sur la formation de la chaîne peptidique à partir de ces précurseurs.

Cet exemple montre qu'il est possible, à partir de gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines et en particulier des Pristinamycines I. Cet exemple montre également qu'il est
15 possible par cette approche de construire des souches de S. pristinaespiralis produisant spécifiquement des Pristinamycines II et par extension des souches produisant spécifiquement des Pristinamycines I. Cette même approche pourrait également être utilisée pour les autres souches d'actinomycètes producteurs de streptogramines.

20 9.4. Construction d'un mutant de S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène snbA.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène snbA, de construire une souche de S. pristinaespiralis SP92 qui ne produit plus de Pristinamycines I. Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la
25 fonctionnalité de la protéine SnbA. Sa construction a été réalisée à l'aide du vecteur suicide, pDH5, décrit dans l'exemple 9.1.

9.4.1. Construction du plasmide pVRC404.

Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez S. pristinaespiralis SP92, qui peut être utilisé pour disrupter par
30 simple recombinaison homologue le gène snbA.

Le plasmide pVRC404 a été construit à partir du plasmide pVRC402 décrit dans l'exemple 6.1., pour réaliser le mutant chromosomique SP92 disrupté dans le gène snbA. Le plasmide pVRC402 a été digéré par les enzymes de restriction XhoI et HindIII. Après séparation des fragments ainsi générés par électrophorèse sur gel

d'agarose à 0.8 %, un fragment de 1170 pb, contenant une partie interne du gène snbA, a été isolé et purifié par Geneclean (Bio101, La Jolla, Californie). La localisation du fragment dans le gène snbA est présentée figure 15A.

100 ng de vecteur pDH5 linéarisés par une digestion SmaI, ont été ligués avec
5 200 ng du fragment de 1170 pb, comme décrit dans l'exemple 3.3. Un clone portant le fragment souhaité a été isolé après transformation de la souche TG1. Le plasmide recombinant a été nommé pVRC404. Le plasmide pVRC404 a été préparé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa carte de restriction est présentée dans la figure 29.

9.4.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène snbA par recombinaison
10 homologue.

Cet exemple illustre comment le mutant de S. pristinaespiralis SP92, disrupté dans le gène snbA, a été construit.

Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC404. La préparation des protoplastes et leur transformation ont été
15 réalisées comme décrit dans l'exemple 9.1. Après transformation des protoplastes de la souche SP92, les recombinants ont été sélectionnés par étalement de 3 ml de milieu SNA contenant 2.6 mg/ml de thiostrepton. Sur les 5 transformations réalisées avec 5 fois 1 µg du plasmide pVRC404, une trentaine de clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants d'environ 5 par µg
20 d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène snbA porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment de 1170 pb du plasmide suicide pVRC404. Les spores des recombinants ont été isolées par étalement et croissance sur milieu R2YE + 400 µg/ml de thiostrepton, et réétalées sur le même milieu pour obtenir des colonies isolées. Afin
25 de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC404, différents Southern de l'ADN total de plusieurs clones recombinants, purifiés comme décrit ci-dessus, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment de 1170 kb utilisés successivement comme sondes après marquage par random priming avec du [α -³²P]dCTP comme décrit dans l'exemple 9.1. Les résultats d'hybridation montrent
30 l'apparition, dans le génome des clones recombinants digérés par les enzymes de restriction XhoI et HindIII, d'une bande XhoI-HindIII supplémentaire de 4,7 kb (vecteur pDH5 + 1,17 kb), par rapport à la souche témoin SP92, hybridant à la fois avec pDH5 et avec le fragment de 1170 pb. La digestion des clones recombinants par l'enzyme de restriction PfIMI (sites encadrant le fragment XhoI-HindIII de 1170 pb)
35 montre la disparition de la bande PfIMI-PfIMI de 3,1 kb et l'apparition d'une bande à

8,8 kb hybridant avec les deux sondes. Ces résultats indiquent que la structure génomique des clones analysés est bien celle que l'on attend après un événement de recombinaison homologue entre pVRC404 et le gène chromosomique snbA. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC404.

5 9.4.3. Production de pristinamycines par le mutant SP92::pVRC404.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène snbA par l'intégration du plasmide pVRC404, ne produit plus de Pristinamycine I.

10 Le mutant SP92::pVRC404, ainsi que la souche SP92, en tant que souche témoin, ont été cultivés en milieu de production liquide. La fermentation, ainsi que le dosage des Pristinamycines I et II, ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 9.1. Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, alors que la souche témoin SP92 produit une quantité standard de Pristinamycines I, aucune trace de Pristinamycines I n'a été détectée dans le moût de fermentation du mutant
15 SP92::pVRC404. Par ailleurs la production de Pristinamycines II par le mutant SP92::pVRC404 est équivalente à celle du témoin SP92. Le mutant SP92::pVRC404 ne produit plus que des Pristinamycines II. Ceci montre bien que le gène snbA code pour une protéine SnbA impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines I, comme il avait été montré lors de la purification dans l'exemple
20 5.2.

Cet exemple montre, comme dans l'exemple précédent, qu'il est possible, à partir de gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines et en particulier des Pristinamycines I. Cet exemple montre également qu'il est possible par cette approche de produire des
25 souches de S. pristinaespiralis produisant spécifiquement des Pristinamycines II et par extension des souches produisant spécifiquement des Pristinamycines I, comme décrit dans l'exemple suivant: 9.5. Cette même approche pourrait également être utilisée pour les autres souches d'actinomycètes producteurs de streptogramines.

30 9.5. Construction d'un mutant de S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène snaD codant probablement pour une peptide synthase impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines II.

Cet exemple illustre comment il est possible par disruption du gène snaD codant probablement pour une peptide synthase impliquée dans la biosynthèse des

Pristinamycines II, de construire une souche de *S. pristinaespiralis* SP92 qui ne produit plus de Pristinamycines II.

Ce mutant a été construit dans le but de confirmer la fonctionnalité du gène *snaD* et d'obtenir une souche dérivée de SP92 ne synthétisant plus que des Pristinamycines I.

Sa construction a été réalisée à l'aide du plasmide PVRC1000 décrit dans l'exemple 6.8. dérivé du vecteur suicide pDH5, capable de se répliquer chez *E. coli* seulement et portant un marqueur de résistance s'exprimant chez *Streptomyces* (cf exemple 9.1.).

9.5.1. Construction du plasmide pVRC1000.

Cet exemple illustre comment il est possible de construire un plasmide ne se répliquant pas chez *S. pristinaespiralis* SP92, qui peut être utilisé pour disrupter par simple recombinaison homologue le gène *snaD*. La construction du plasmide pVRC1000 portant une partie du gène *snaD* est décrit dans l'exemple 6.8.

9.5.2. Isolement du mutant SP92 disrupté dans le gène *snaD* par recombinaison homologue.

Cet exemple illustre comment le mutant de *S. pristinaespiralis* SP92, disrupté dans le gène *snaD*, a été construit. Ce mutant a été isolé par transformation de la souche SP92 avec le plasmide suicide pVRC1000. La préparation des protoplastes et leur transformation ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 9.1. Sur les 5 transformations réalisées avec 1 µg de pVRC1000 environ 1500 clones résistants au thiostrepton ont été isolés. Ceci donne un taux de recombinants d'environ 375 par µg d'ADN. Ces recombinants résultent de l'intégration par simple recombinaison homologue entre le gène *snaD* porté par le chromosome de la souche SP92 et le fragment *Bam*HI-*Sst*I de 1,5 kb du plasmide suicide pVRC1000. Une vingtaine de recombinants a été repiquée sur milieu R2YE contenant 400 µg/ml de thiostrepton et les spores de ces recombinants ont été isolées par réétalement et croissance sur milieu R2YE contenant 400 µg/ml de thiostrepton.

Afin de vérifier la position de l'intégration du plasmide pVRC1000, différents Southern de l'ADN total de 7 clones recombinants, purifiés comme décrit ci-dessus, ont été réalisés et hybridés avec le vecteur pDH5 et le fragment *Bam*HI-*Sst*I de 1,5 kb contenu dans PVRC1000 utilisés successivement comme sondes après marquage avec du [α -³²P]dCTP comme décrit dans l'exemple 9.1. Les résultats d'hybridation montrent l'apparition, dans le génome des 7 clones recombinants, d'une

bande EcoRI de 13,8 kb et d'une bande BglII de 17 kb environ hybridant avec les 2 sondes ainsi que d'une bande EcoRI de 3,7 kb hybridant avec la sonde BamHI-SstI de 1,5 kb. Un de ces mutants a été nommé SP92::pVRC1000 et correspond bien à l'intégration par simple recombinaison homologue du plasmide pVRC1000 dans le gène snaD.

9.5.3. Production de pristinamycines par le mutant SP92::pVRC1000.

Cet exemple illustre comment il est déterminé que le mutant de S. pristinaespiralis SP92 disrupté dans le gène snaD par l'intégration du plasmide pVRC1000, ne produit plus de Pristinamycines II mais seulement des Pristinamycines I. Le mutant SP92::pVRC1000 ainsi que la souche témoin SP92 ont été cultivées en milieu de production liquide et leurs productions de Pristinamycines II et I dosées comme décrit dans l'exemple 9.1.

Les résultats ont montré que, dans les conditions de fermentation réalisées et pour les trois temps testés, le mutant SP92::pVRC1000 produit 0 mg/l de Pristinamycines II et une quantité de Pristinamycines I équivalente à celle du témoin SP92. Ce mutant est donc bien bloqué dans une étape de biosynthèse des Pristinamycines II, ce qui montre que le gène snaD code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des Pristinamycines II, et très probablement pour une peptide synthase.

Cet exemple montre, comme dans l'exemple précédent, qu'il est possible, à partir de gènes de biosynthèse clonés, de construire des souches mutées dans les étapes de biosynthèse des Pristinamycines et en particulier des Pristinamycines II. Cet exemple montre également qu'il est possible par cette approche de produire des souches de S. pristinaespiralis produisant spécifiquement des Pristinamycines I et par extension des souches produisant spécifiquement des Pristinamycines II. Cette même approche pourrait également être utilisée pour les autres souches d'actinomycètes producteurs de streptogramines.

EXEMPLE 10 : Complémentation d'un mutant non producteur de la souche SP92.

Cet exemple montre comment il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Pristinamycines. Cette expression a été plus particulièrement réalisée pour les gènes snaA et snaB portés par le cosmide pIBV1, dans une souche mutante dérivée de SP92 : SP120. Ce mutant ne produit pas de Pristinamycine IIA. Il

accumule le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de la Pristinamycine II : Pristinamycine IIB.

10.1. Clonage des gènes *snaA* et *snaB* dans le vecteur navette pIJ903.

Cet exemple illustre comment un sous-fragment du cosmide pIBV1, contenant
5 les gènes *snaA* et *snaB*, a été cloné dans un vecteur capable de se répliquer à la fois chez *E. coli* et chez *Streptomyces*.

Le vecteur pIJ903 (Lydiat D. J. et al., 1985) est un vecteur navette à faible nombre de copies (1 à 3 par cellule), capable de se répliquer à la fois chez *E. coli* grâce à son origine de répllication de pBR322 et chez *Streptomyces* grâce à son
10 origine de répllication de SCP2*. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection dans *E. coli* et le gène de résistance au thiostrepton permet la sélection dans *Streptomyces*.

Le cosmide pIBV1 a été digéré par l'enzyme de restriction *Sst*I. Un large fragment d'ADN de 7,6 kb portant les gènes *snaA* et *snaB* a été isolé par
15 électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroélué. 500 ng de ce fragment ont été ligués avec 100 ng du vecteur pUC1813 (Kay et McPherson, 1987) linéarisé par *Sst*I. Après transformation de la souche *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (*f80*)*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) et sélection des transformants sur milieu LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline et 20 μ g/ml de X-gal, un clone portant
20 le fragment de 7,6 kb a été isolé. Le plasmide a été nommé pVRC506. Une préparation de ce plasmide recombinant a été réalisée comme décrit dans l'exemple 2.1.

Le clonage dans le vecteur pIJ903 a été réalisé au site *Hind*III. Le plasmide pVRC506 a été coupé par *Hind*III et le fragment de 7,6 kb portant les gènes *snaA* et
25 *snaB* a été isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % et électroélué. 500 ng de ce fragment ont été ligués avec 500 ng du vecteur pIJ903 linéarisés par *Hind*III. Après transformation de la souche *E. coli* DH5 α et sélection des transformants sur LB solide contenant 150 μ g/ml d'ampicilline, un clone portant le fragment de 7,6 kb a été isolé. Le plasmide a été nommé pVRC507. Une préparation de ce plasmide
30 recombinant a été réalisé comme décrit dans l'exemple 2.1. Sa cartographie est présentée figure 30.

10.2. Expression des gènes *snaA* et *snaB* dans le mutant SP120.

Cet exemple illustre comment il est possible de produire les protéines SnaA et SnaB chez *S. pristinaespiralis* SP92, par introduction dans cette souche, d'un

plasmide portant les gènes de structure correspondants. L'expression des gènes snaA et snaB a été réalisée après transformation de la souche mutante SP120 avec 500 ng de plasmide pVRC507. La transformation des protoplastes de SP120 et la sélection des transformants au thiostrepton a été réalisée comme décrit dans l'exemple 9.1.2.

5 De nombreux transformants ont été ainsi obtenus et 3 d'entre eux ont été choisis pour les tests de production en milieu liquide. La souche SP120 portant le plasmide pIJ903 a été choisie comme témoin. Les fermentations ainsi que l'extraction des produits de biosynthèse ont été réalisés comme décrit en l'exemple 9.1.3.

10 Les résultats ont montré que dans les conditions de fermentation réalisées, alors que le témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903) a produit à 24, 28 et 32 heures de fermentation, 100 % de P IIB et 0 % de P IIA, les 3 clones de la souche SP120 transformés par le plasmide pVRC507, ont produit pour ces mêmes temps, environ 85 à 80 % de Pristinamycine IIB et 15 à 20 % de Pristinamycine IIA, dont la
15 somme est équivalente en quantité à la production de Pristinamycine IIB de la souche témoin (SP120 portant le plasmide pIJ903). Les clones portant pVRC507 ont bien été partiellement complétés pour l'étape de biosynthèse des Pristinamycines II correspondant à l'oxydation de la liaison 2-3 de la D-proline de l'intermédiaire Pristinamycine IIB. Ceci a été confirmé par dosage enzymatique de l'activité
20 Pristinamycine IIA synthase, comme décrit dans l'exemple 5.1.1.A., pour les souches SP120 portant pVRC507 et SP120 portant pIJ903. Alors que la souche témoin SP120 portant pIJ903, ne présente aucune activité Pristinamycine IIA synthase, la souche SP120 portant pVRC507, présente une activité PIIA synthase.

Cet exemple montre qu'il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des
25 Streptogramines. Cette expression a été étudiée plus particulièrement pour les gènes codant pour la Pristinamycine IIA synthase mais les autres gènes de biosynthèse des Pristinamycines II et des Pristinamycines I et ainsi que ceux impliqués dans la biosynthèse des composants des différentes Streptogramines peuvent être ainsi exprimés. Cette expression peut être réalisée dans des souches mutantes comme c'est
30 le cas dans l'exemple 10, mais également dans des souches productrices afin d'augmenter les niveaux de production des Streptogramines. L'expression peut être modifiée par clonage des gènes dans un vecteur à nombre de copies différent (faible ou élevé) ou dans un vecteur intégratif, par dérégulation de ces gènes, par clonage de ces gènes sous un promoteur homologue ou hétérologue (promoteur fort ou régulé
35 spécifiquement). L'expression des différents gènes de biosynthèse des

Streptogramines peut également être réalisée dans des souches hétérologues à partir de vecteurs d'expression adaptés, afin de produire des antibiotiques hybrides.

EXEMPLE 11 : Expression du gène papM de S. pristinaespiralis dans E. coli

5 Cet exemple illustre comment il est possible d'exprimer un gène de S. pristinaespiralis dans E. coli de manière à pouvoir identifier, purifier et étudier la protéine codée par ce gène.

11.1. Construction du plasmide pVRC706.

10 L'expression du gène papM dans E. coli est obtenue en plaçant ce gène en aval du promoteur et du site de fixation des ribosomes du gène lacZ de E. coli. Le fragment MluI-StuI de 1,7 kb a été isolé du plasmide pVRC409 décrit dans l'exemple 7.8. puis cloné dans le plasmide pMTL23 (Chambers et al., 1988) coupé au site BamHI rempli ultérieurement à l'aide de l'enzyme Klenow (Maniatis et al., 1989) et au site MluI pour donner le plasmide pVRC 706 représenté sur la figure 31. Le
15 clonage au site MluI permet d'obtenir une fusion en phase entre les 32 premiers acides aminés de la β -galactosidase codée par le gène lacZ du plasmide pMTL23 et les onze derniers acides aminés du gène situé juste en amont de papM, ce qui permet de préserver le couplage traductionnel qui semble exister entre le gène papM et ce gène amont au vu de la séquence nucléotidique donnée dans l'exemple 7.8. Ainsi
20 l'expression du gène hybride entre lacZ et le gène amont de papM et celle du gène papM est sous le contrôle des signaux d'expression du gène lacZ.

11.2. Expression dans la souche E. coli DH5 α du produit du gène papM.

Les plasmides pVRC706 et pMTL23 ont été introduits par transformation dans la souche de E. coli DH5 α et l'expression de leurs gènes étudiée dans les conditions
25 où le promoteur du gène lacZ est induit comme cela est déjà décrit (Maniatis et al., 1989). Les souche de E. coli portant le plasmide pVRC706 ou le plasmide contrôle pMTL23 ont été cultivées dans 500 ml de milieu riche LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline et 1 mM d'IPTG permettant l'induction du promoteur du gène lacZ. On prélève ces cultures lorsqu'elles ont atteint une densité optique à 600 nm voisine de 1
30 et on prépare les extraits protéiques comme il est décrit ci-dessous.

11.3. Dosage de l'activité du produit du gène papM exprimé dans E. coli.

L'activité correspondant à la protéine codée par le gène papM est dosée pour les deux extraits préparés à partir des cultures de E. coli portant le plasmide pVRC706 ou le plasmide pMTL23 (exemple 5.7). Il a été montré que l'extrait préparé à partir de la souche E. coli::pVRC706 catalyse la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine avec une activité de 235 unités/mg, alors que cette activité est absente dans les extraits de la souche contrôle E. coli::pMTL23 (voir exemple 5.7.1.C.). Ces résultats indiquent qu'il est possible d'exprimer le gène papM de S. pristinaespiralis dans E. coli et que la protéine correspondante est bien l'enzyme catalysant la méthylation de la p-aminophénylalanine en p-diméthylaminophénylalanine. Cet exemple montre qu'il est possible d'exprimer des gènes de biosynthèse des Streptogramines dans des souches hétérologues (telles que E. coli, mais aussi dans d'autres microorganismes) à partir de vecteurs d'expression adaptés afin de produire des précurseurs d'antibiotiques ou même des antibiotiques naturels ou hybrides.

EXEMPLE 12 : Mise en évidence de l'homologie de gènes impliqués dans la biosynthèse des streptogramines, chez différents Streptomyces.

Cet exemple illustre comment il est possible de mettre en évidence, par hybridation sur des ADN totaux, l'homologie existant entre différents gènes impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines chez différentes souches de Streptomyces productrices de Streptogramines.

12.1. Extraction de l'ADN total de différents Streptomyces producteurs de Streptogramines.

Cet exemple illustre comment l'ADN des différentes souches productrices de streptogramines a été purifié. Ces souches de Streptomyces ont été choisies parmi celles décrites dans le tableau 1 :

Streptomyces loïdensis

Streptomyces olivaceus

Streptomyces ostréogriseus

Streptomyces virginiae

Une souche non productrice de streptogramines : Streptomyces hygroscopicus a été choisie comme témoin négatif.

Les extractions des différents ADN totaux ont été réalisées à partir de cultures en milieu YEME, comme décrit dans l'exemple 1.

12.2. Hybridation des ADNs totaux de souches productrices de Streptogramines par des fragments d'ADN contenant des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines et isolés de la souche *S. pristinaespiralis* SP92.

Cet exemple illustre comment il est possible à partir de gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines et isolés de la souche SP92 comme décrit dans les exemples précédents, de mettre en évidence des gènes homologues par hybridation des ADN totaux d'autres souches productrices de Streptogramines.

10 Les fragment d'ADN utilisés comme sonde ont été :

Le fragment XhoI-XhoI de 3,6 kb isolé à partir du pVRC1106 décrit dans l'exemple 6.5. et dont la carte de restriction est présentée figure 18. Ce fragment contient une partie du gène codant pour la Pristinamycine I synthase II.

15 Le Fragment BamHI-BamHI de 6 kb isolé à partir du plasmide pXL2045, décrit dans l'exemple 6.3. et dont la carte est présentée dans la figure 16. Ce fragment contient les gènes de structure des deux sous-unités de la PIIA synthase.

20 Les ADN totaux des quatre souches productrices de Streptogramines, de la souche *S. hygroscopicus* ainsi que de la souche SP92 ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI et XhoI. Les fragments d'ADN ainsi obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0.7 % et l'ADN a été transféré sur membrane de nylon comme décrit par Maniatis et al. (1989). Le marquage des fragments XhoI-XhoI de 3,6 kb et BamHI-BamHI de 6 kb a été réalisé par marquage par random priming, comme décrit dans l'exemple 9.1.2. Les hybridations des membranes ont été réalisées en présence de 50 % de formamide à 42°C, comme décrit dans Maniatis et al. (1989).
25 Les lavages des membranes après hybridation, ont été réalisés à 50 et 60°C dans une solution contenant du SSC (Maniatis et al. 1989) dilué 10 fois et du SDS 0.1 %.

Ces hybridations mettent en évidence les résultats suivants :

La souche *S. hygroscopicus* ne présente aucune hybridation avec les deux sondes utilisées.

30 Les ADN totaux (digérés par XhoI et BamHI) des souches *S. ostreogriseus*, *S. olivaceus*, *S. loïdensis* et *S. virginiae* présentent tous des signaux d'hybridation d'intensité comparable à ceux observés sur l'ADN total de la souche SP92 avec les deux sondes utilisées.

Cet exemple montre que différentes souches de *Streptomyces* produisant des Streptogramines, comportent des gènes hybridant avec des gènes isolés chez *S. pristinaespiralis* SP92 et impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines, comme décrit dans les exemples précédents. Ces hybridations mettent ainsi en
5 évidence l'homologie existant entre les gènes impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines de la souche SP92 et ceux impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines des autres souches productrices de Streptogramines.

Cet exemple montre donc qu'il est possible à partir des gènes isolés de SP92 et impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines d'isoler par hybridation et
10 clonage, les gènes homologues présents chez les autres souches productrices de Streptogramines.

EXEMPLE 13 : Etude de la liaison physique des différents gènes de *S. pristinaespiralis* SP92 impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des pristinamycines II.

15 Cet exemple illustre comment il est possible d'étudier la liaison physique des gènes de *S. pristinaespiralis* SP92 impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et II. Cette étude a été menée dans le but de montrer que tous ces gènes sont groupés sur le chromosome en un cluster et qu'il est donc possible en marchant sur le chromosome à partir des gènes déjà identifiés d'isoler d'autres gènes
20 impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et II. Une telle démarche peut être envisagée pour les gènes impliqués dans la biosynthèse d'autres Streptogramines.

13.1. Enzymes de restriction utilisées pour l'électrophorèse à champs pulsé.

Le génome de *S. pristinaespiralis* SP92 est composé de 70 % à 75 % de
25 nucléotides contenant les bases G et C. Pour couper son génome en un faible nombre de grands fragments, nous avons utilisé des enzymes qui reconnaissent une séquence riche en AT telles que *AseI* (AT/TAAT), *SspI* (AAT/ATT) mais aussi *HindIII* (A/AGCTT), *EcoRI* (G/AATTC), *NdeI* (CA/TATG) et *ClaI* (AT/CGAT).

13.2. Souches de *S. pristinaespiralis* utilisées pour l'électrophorèse à champs pulsé.

30

Nous avons utilisé l'ADN chromosomique de plusieurs souches pour étudier par électrophorèse à champ pulsé la liaison physique des gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des Pristinamycines II. Nous avons préparé des

inserts comme il est décrit dans l'exemple 4.1. de l'ADN chromosomique de la souche S. pristinaespiralis SP92, mais aussi de l'ADN chromosomique des souches dérivées de SP92 dont la construction est décrite dans les exemples 9.1. et 9.4. Il s'agit de la souche SP92::pVRC505 dont le gène snaA a été disrupté par intégration
5 du plasmide pVRC505 (exemple 9.1) et de la souche SP92::pVRC404 dont le gène snbA a été disrupté par intégration du plasmide pVRC404 (exemple 9.4). Ces deux dernières souches ont été incluses dans cette étude car elles ont permis de positionner précisément les gènes snaA et snbA sur la carte chromosomique en exploitant la présence de sites coupant rarement l'ADN chromosomique AseI, SspI, HindIII,
10 EcoRI, NdeI et ClaI dans les plasmides pVRC505 et pVRC404.

13.3. Sondes d'ADN utilisées pour les hybridations des fragments isolés par électrophorèse à champs pulsé.

Nous avons utilisé différents fragments d'ADN pour obtenir des sondes marquées radioactivement comme il est décrit dans l'exemple 9.1. que nous avons
15 hybridées aux fragments séparés par électrophorèse à champs pulsé après coupure enzymatique des inserts d'ADN chromosomique des trois souches présentées ci-dessus (exemple 4.2). Les sondes sont les suivantes : le fragment EcoRI-BamHI de 3,2 kb isolé du plasmide pVRC701 portant les gènes snaB et samS (cf exemple 9.2), le fragment BamHI-SstI de 1,5 kb isolé du plasmide pVRC 1000 portant une
20 partie du gène snaD (cf exemple 6.8.), le fragment XhoI-HindIII de 1,1 kb isolé du plasmide pVRC402 portant le gène snbA (cf exemple 6.1), le fragment PstI-PstI de 2,4 kb isolé du plasmide pVRC900 portant le gène papA (cf exemples 6.7 et 8.8) et le fragment XhoI-PstI de 1,5 kb isolé du plasmide pVRC509 portant le gène snaC (cf exemple 6.9.).

13.4. Localisation sur le chromosome des différents gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et II et étude de leur liaison physique.

Les hybridations avec les différentes sondes décrites précédemment des ADN chromosomiques des souches S. pristinaespiralis SP92, SP92::pVRC404 et SP92::pVRC505 coupés par simples digestions et doubles digestions à l'aide des six
30 enzymes mentionnées ci-dessus ont conduit à la cartographie générale représentée sur la figure 32 : la position de sites importants a été indiquée, ainsi que la position et le sens de transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des pristinamycines PI et PII. On a ainsi pu calculer la distance séparant les 3 régions chromosomiques contenant les gènes identifiés : celle des gènes snbA, snbR, papA et papM (cosmide

pIBV2, exemple 5.2) celle des gènes snaA, snaB, samS, snaD snbC, snbD, snbE (cosmides pIBV1 et 3, exemple 5.1), et enfin celle du gène snaC (cosmide pIBV4, exemple 5.6). Par exemple, la distance entre les gènes snaA et snbA a été évaluée à environ 160-170 kb. Ceci montre que les gènes déjà identifiés sont tous contenus
5 dans une région couvrant seulement 200 kb du chromosome de la souche S. pristinaespiralis soit moins de 3 % de la longueur totale du génome que nous avons pu estimer à 7500 kb par la technique d'électrophorèse à champs pulsé.

Ces résultats montrent que les gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et II sont groupés sur le chromosome en un cluster et qu'il est donc
10 possible en marchant sur le chromosome à partir des gènes déjà identifiés d'isoler d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse des Pristinamycines I et des Pristinamycines II. Plus généralement, il est possible en marchant sur le chromosome, à partir de tout gène impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, d'identifier les autres gènes impliqués dans cette biosynthèse.

TABLEAU 1

MICROORGANISMES	ANTIBIOTIQUES
<p>CHAMPIGNONS</p> <p><u>Micromonospora</u> sp.</p> <p>STREPTOMYCES</p> <p><u>S. alborectus</u></p> <p><u>S. conganensis</u> (ATCC13528)</p> <p><u>S. diastaticus</u></p> <p><u>S. graminofasciens</u></p> <p><u>S. griseus</u> (NRRL2426)</p> <p><u>S. griseoviridus</u></p> <p><u>S. griseoviridus</u> (FERMP3562)</p> <p><u>S. lavendulae</u></p> <p><u>S. loïdensis</u> (ATCC11415)</p> <p><u>S. mitakaensis</u> (ATCC15297)</p> <p><u>S. olivaceus</u> (ATCC12019)</p> <p><u>S. ostréogriseus</u> (ATCC27455)</p> <p><u>S. pristinaespiralis</u> (ATCC25486)</p> <p><u>S. virginiae</u> (ATCC13161)</p> <p>ACTINOMYCETES</p> <p><u>A. auranticolor</u>(ATCC31011)</p> <p><u>A. azureus</u> (ATCC31157)</p> <p><u>A. daghestanicus</u></p> <p><u>A. philippinensis</u></p> <p><u>Actinoplanes</u> sp. (ATCC33002)</p> <p><u>Actinoplanes</u> sp.</p> <p><u>Actinomadura flava</u></p>	<p>Vernamycines</p> <p>Virginiamycines</p> <p>F1370 A, B</p> <p>Plauracines, Streptogramines</p> <p>Streptogramines</p> <p>Viridogriséine (Etamycine)</p> <p>Griseoviridine</p> <p>Néoviridogriséines</p> <p>Etamycines</p> <p>Vernamycines</p> <p>Mikamycines</p> <p>Synergistines (PA114 A, B)</p> <p>Ostréogrycines</p> <p>Pristinamycines</p> <p>Virginiamycines</p> <p>(Staphylomycines)</p> <p>Plauracines</p> <p>Plauracines</p> <p>Etamycine</p> <p>A-2315 A, B, C</p> <p>A15104</p> <p>A17002 A, B, C, F</p> <p>Madumycines</p>

Abréviations utilisées :

	ADN :	acide déoxyribonucléique
	AMP :	adénosine 5'-monophosphate
	ATP :	adénosine 5'-triphosphate
5	BET :	bromure d'éthidium
	bis-tris :	(bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methane
	bis-tris propane :	(1,3-bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]propane)
	BSA :	bovine serum albumine
	CLHP :	chromatographie liquide haute performance
10	DO :	Densité optique
	DTE :	dithioerythritol
	DTT :	dithiothréitol
	E64 :	trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
	EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
15	EGTA :	acide éthylèneglycol bis (β -aminoéthyl) tétraacétique
	FMN :	flavine mononucleotide
	FMNH ₂ :	flavine mononucleotide réduite
	Hepes :	(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
	IPTG :	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
20	kDa :	kilodalton
	kb :	kilobase
	LB :	Luria broth (milieu de croissance riche pour <u>E. coli</u>)
	NAD :	nicotinamide dinucleotide
	NADH :	nicotinamide dinucleotide réduit
25	PAGE :	électrophorese sur gel polyacrylamide
	pb :	paire de base
	PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
	PPi :	pyrophosphate
	rpm :	révolution/min
30	S.A. :	sulfate d'ammonium
	SAM :	S-adénosylméthionine
	SDS :	sodium dodecyl sulfate
	STI :	inhibiteur de trypsine du soja
	TE :	tampon 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
35	Tris :	amino-2-hydroxylméthyl-2 propanediol-1,3
	U.V. :	rayons ultra-violets
	Xgal :	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside
	YEME :	yeast extract-malt extract medium (milieu de croissance riche pour <u>Streptomyces</u>)
40	PEG :	Polyéthylène glycol
	LMP :	Low melting point
	PM :	Poids moléculaire

Bibliographie :

- Anzai H., Murakami T., Imai A., Satoh A., Nagaoka K. et Thompson C. J. (1987) *J. Bacteriol.*, 169 : 3482-3488.
- Bancroft I. et WolK C. P. (1989) *J. Bacteriol.*, 171 : 5949-5954.
- Bibb M. J., Findlay P. R. et Johnson M. W. (1984) *Gene*, 30 : 157-166.
- Birnboim H. C. et Doly J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, 7 : 1513-1523.
- Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D.D., Schumm J.W., Sheldon E. L. et Smithies O. (1977) *Science*, 196 : 161-169.
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H. et Falkow S. (1977) *Gene*, 2 : 95-113.
- Boyer H. W. et Roulland-Dussoix D. (1969) *J. Mol. Biol.*, 41 : 459.
- Chater K. F. (1990) *Bio/Technology*, 8 : 115-121.
- Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, 43 : 145-198.
- Cocito C. G. (1983) *In Antibiotics*, 6 : (Ed. F. E. Hahn), 296-332.
- Dessen P. C., Fondrat C., Valencien C. et Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, 6 : 355-356.
- Di Giambattista M., Chinali G. et Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, 24 : 485-507.
- Fernandez-Moreno M. A., Caballero J. L., Hopwood D. A. et Malpartida F. (1991) *Cell*, 66 : 769-780.
- Gibson T. J. (1984) *Ph.D. thesis*, Cambridge University, England.
- Hallam S. E., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1988) *Gene*, 74 : 305-320.
- Hames B. D. et Higgins S. J. (1985) *IRL Press Ltd., Oxford, U. K.*,
- Hanahan D. (1983) *J. Mol. Biol.*, 166 : 557
- Hillemann D., Pülher A. et Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 727-731.
- Hohn B. et Collins J. F. (1980) *Gene*, 11 : 291-298.
- Hook J. D. et Vining L. C. (1973) *J.C.S. Chem. Comm.*, 185-186.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. et Scrempf H. (1985) *A laboratory manual*, The John Innes Fondation, Norwich, England.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Janssen G. R., Malpartida F. et Smith C. (1986b) *In Regulation of gene expression - 25 years on (ed. I; A. Booth C; F. Higgins)*, 251-276.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd A. M., Floss H. G. et Omura S. (1985a) *Nature*, 314 : 642-644.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H. et Omura S. (1985b) *In Microbiology (ed S. Silver). American Society for Microbiology, Washington D. C.*, 409-413.
- Hopwood D. A., Malpartida F. et Chater K. F. (1986a) *In Regulation of secondary metabolite formation. (eds. H. Kleinkauf, H. von Hohen, H. Dornauer G. Nesemann)*, 22-33.
- Hoshino T., Ikeda T., Tomizuka N. et Furukawa K. (1985) *Gene*, 37 : 131-138.

- Hutchinson C. R., Borell C. W., Otten S. L., Stutzman-Engwall K. J. et Wang Y. (1989) *J. Med. Chem.*, 32 : 929-937.
- Ish-Horowitz D. et Burk J. F. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 2989-2998.
- Kanehisa M. I. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12 : 203-215.
- Kay R. et McPherson J. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15 (6) : 2778.
- Khan S. A. et Novick R. (1983) *Plasmid*, 10 : 251-259.
- Kingston D. G. I., Kolpak M. X., Lefevre W. et Borup-Grochtmann I. B. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105 : 5106-5110.
- Kyte J. et Doolittle R. (1982) *J. Biol. Mol.*, 157 : 105-135.
- Low B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60 : 160.
- Lydiat D. J., Malpartida F. et Hopwood D. A. (1985) *Gene*, 35 : 223-235.
- Maniatis T., Fritsh E. F. et Sambrook J. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Meinkoth J. et Wahl G. (1984) *Anal. Biochem.*, 138 : 267-284.
- Messing J., Crea R. et Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309.
- Neal R. J. et Chater K. F. (1987) *Gene*, 58 : 229-241.
- Ohnuki T., Imanaka T. et Aiba S. (1985) *J. Bacteriol.*, 164 : 85-94.
- Sawadogo M. et Van Dyke M. W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 674.
- Staad J. F., Elkins M. F. et Earhart C. F. (1989) *FEMS Microbial. Lett.*, 59 : 15.
- Staden R. et McLachlan A. D. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10 : 141-156.
- Videau D. (1982) *Path. Biol.*, 30 : 529-534.
- Chambers S. P., Prior S. E., Barstow D. A. et Minton N. P. (1988) *Gene*, 68: 139.
- Gutierrez S., Diez B., Montenegro E. et Martin J.F. (1991) *Journal of bacteriology*, 173: 2354-2365.
- Hori K., Yamamoto Y., Minetoki T., Kurotsu T., Kanda M., Miura S., Okamura K., Kuruyama J. et Saito Y. (1989) *J. Biochem.*, 106: 639-645.
- Horikawa S., Ishikawa M., Ozaka H. et Tsukada K. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 184: 497-501.
- Kaplan J., Merkel W. et Nichols B. (1985) *J. Mol. Biol.*, 183: 327-340.
- Markham G.D., DeParasis J. et Gatmaitan J. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259: 14505-14507.
- Sharka B., Westlake D. W. S. et Vining L. C. (1970) *Chem. Zvesti*, 24: 66-72.
- Thomas D., Rothstein R., Rosenberg N. et Surdin-Kerjan Y. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8: 5132-5139.
- Turgay K. et al (1992) *Molecular Microbiology*, 6(4) : 546.
- Weckermann R., Fyrbab R. et Marahiel M.A. (1988) *Nucl. Acids Res.*, 16: 11841
- Yanisch-Perron C., Vieira J. et Messing J. (1985) *Gene*, 33: 103-119.
- Zimmer W., Aparicio C. et Elmerich C. (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 229: 41-51.
- Reed et al. *J.Nat.Prod* 49 (1986) 626
- Molinero et al., *J.Nat.Prod* 52 (1989) 99
- Reed et al. *J.Org.Chem.* 54 (1989) 1161
- Watanabe et al., *Mol.Cell.Biochem.* 44 (1982) 181
- Jablonski et al., *Biochemistry* 16 (1977) 2832
- Duane et al., *Mol.Cell.Biochem.* 6 (1975) 53.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION : POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES STREPTOGRAMINES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5392 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

GGATCCTGGC GTCCGCCGTC AAGAACTGAA CCGAGGAGAC ACCCACCATG ACCGCACCCC      60
GCCGGCGCAT CACCCTCGCC GGCATCATCG ACGGCCCGG CGGCCATGTG GCCGCCTGGC      120
GCCACCCGGC GACCAAGGCG GACGCCCAGC TCGACTTCGA ATTCCACCGC GACAACGCCC      180
GCACCCTCGA ACGCGGCCTG TTCGACGCCG TGTTCATCGC GGACATCGTC GCCGTGTGGG      240
GCACCCGCCT GGA CTCCCTG TGCCGCACCT CGCGCACCGA GCACTTCGAA CCGCTCACCC      300
TGCTCGCCGC CTACGCCGCG GTCACCGAGC ACATCGGCCT GTGCGCCACC GCCACCACCA      360
CGTACAACGA ACCGGCGCAC ATCGCCGCCC GCTTCGCCTC CCTCGACCAC CTCAGCGGCG      420
GCCGGGCGG CTGGAACGTC GTCACCTCCG CCGCACCGTG GGAGTCCGCC AACTTCGGCT      480
TCCCCGAGCA CCTGGAGCAC GGCAAACGCT ACGAGCGGGC CGAGGAGTTC ATCGACGTCG      540

```

TCAAAAACT GTGGGACAGC GACGGCCGCC CCGTCGACCA CCGCGGCACC CACTTCGAGG 600
CCCCCGGCC GCTCGGGATC GCCCGCCCC CGCAGGGCCG CCCCCTCATC ATCCAGGCCG 660
GCTCCTCGCC GGTGGGACGC GAGTTCGCCG CCCGGCACGC CGAGGTCATC TTCACCCGGC 720
ACAACCGGCT CTCCGACGCC CAGGACTTCT ACGGCGACCT CAAGGCACGC GTCGCCCCGGC 780
ACGGCCGCGA CCCCAGAGAAG GTCTCTGTGT GGCCGACCCT CGCGCCGATC GTCGCCGCCA 840
CCGACACCGA GCGAAGCAG CGCTGCAGG AACTGCAGGA CCTCACCAC GACCATGTCG 900
CCCTGCGCAC CCTTCAGGAC CACCTCGGCG ACGTCGACCT GAGCGCGTAC CCGATCGACG 960
GGCCCGTCCC CGACATCCCG TACACCAACC AGTCCCAGTC GACGACCGAG CGGCTGATCG 1020
GCCTGGCCAG GCGCGAGAAC CTCAGCATCC GCGAGCTGGC CCTGCGGCTG ATGGGCGACA 1080
TCGTCGTCGG CACACCGGAG CAGCTCGCCG ACCACATGGA GAGCTGGTTC ACCGGCCGCG 1140
GCGCCGACGG CTTCAACATC GACTTCCCGT ACCTGCCGGG CTCCGCCGAC GACTTCGTCG 1200
ACCACGTGGT GCCCGAAGTG CAGCGCCGCG GCCTGTACCG CTCGGGCTAC GAGGGCACCA 1260
CCCTGCGGGC CAACCTCGGC ATCGACGCCC CCCGGAAGGC AGGTGCAGCG GCTTGACTTC 1320
CGTCCTAAAG GCGGGGGATT CCAGCGGTCG CCCGCTGGGG TTCCTGCTTC ACCGACGACC 1380
GCCCCGTCCG GGAGGACTCC CGTTGAGGTC TTATACCGTC TCCACAGGCC GACGCCGCCA 1440
GCCCGGCGGC CAGGATGTTG CGTGCCGCAT TCACGTCGCG GTCATGCACA GCGCCGCAGT 1500
CGCACGTCCA CTCCCGGACG TTCAGCGGCA GCTTCCCGCG GACCGTGCCG CAGGTTCGCG 1560
ACAGCTTGA GCTGGGGAAC CAGCGGTCGA TCACGACGAG TTCGCGCCCA TACCAGGCGC 1620
ACTTGTA CTC CAGCATGGAG CGCAGTTCCG TCCAGGCCGC GTCGGAGATG GCGCGCGCGA 1680
GCTTGCCGTT CTTTCAGCAGG TTGCGGACGG TGAGGTCCTC GATCACGACC GTTTGGTTCT 1740
CACGGACGAG TCGAGTCGAC AGCTTGTGGA GGAAGTCGCA GCGCCGGTCG GTGATCCGGG 1800
CGTGGACGCG GCGGACCTTG CGGCGGGCTT TCTTCCGGTT CGCCGACCCC TTCGCCTTGC 1860
GCGACACGTC CCGCTGAGCC TTCGCGAGGC GGGCGCGGTC ACGGCGCTCG TGCTTGGGGT 1920
TGGTGATCTT CTCCCCGGTG GACAGGGTCA CCAGGGAGGT GATCCCGGCG TCGATGCCGA 1980
CGGCCGCCGT GGTGGCGGGC GCGGGGGTGA TGGTGTCCTC GCACAGCAGG GACACGAACC 2040
AGCGGCCCCG ACGGTCGCGG GACACGGTCA CCGTCGTCGG CTCCGCCCCCT TCGGGAAGGG 2100
GACGGGACCA GCGGATGTCC AGGGGCTCCG CGGTCTTCGC CAGCGTGAGC TGTCCGTTAC 2160
GCCACGTGAA GCGCTGCGG GTGTACTCGG CCGACGCCCT GGACTTTTTTC CGCGACTTGT 2220
ACCGCGGGTA CTTTCGACCGC TTGGCGAAGA AGTTGGCGAA CGCCGTCTGC AAGTGCCGCA 2280
GCGCCTGCTG GAGCGGGACG GAGGACACCT CCGAGAGGAA GGCGAGTTCT TCGGTCTTCT 2340
TCCACTCCGT CAGCGCGGCG GACGACTGCA CGTAGGAGAC CCGGCGCTGC TCGCCGTACC 2400

AGGCTCGCGT GCGCCCTCA AGCGCCTTGT TGTACACGAG GCGGACACAG CCGAACGTGC 2460
GGGACAGCTC AGCCGCCTGC TCGTCCGTGG GATAAAAGCG GTACTTGAAA GCCCGCTTGA 2520
CCTGCTGCAT CACGCCTCAC ACGCTATCAG TTCCCGTGTG AGCGGCGGGT GTCTGCCGGT 2580
GGTTGCAGAC GCCGAACCGC CCTGGCGGCG ATTGCCCCAT CCCTGCCCTG CTCCGCAAGA 2640
GCTTCGTCTC CTCCCCGGTC TGAAGGCCGG GGTATCCACG AAGGAATTCT GATGACCGCG 2700
CCCATCCTCG TCGCCACCCT CGACACCCGC GGCCCCGCGG CCACCCTCGG CACGATCACC 2760
CGGCGCGTGC GGGCCGCGGA GGCCGCGGA TTCGACGCGG TCCTGATCGA CGACCGGGCC 2820
GCCGCGGCG TCCAGGGCCG GTTCGAGACG ACGACGCTGA CCGCCGCGCT GGCCGCGCTC 2880
ACCGAGCACA TCGGCCTGAT CACCGCCCCG CTCCCGGCCG ACCAGGCCCC CTACCACGTG 2940
TCCCGGATCA CCGCCTCGCT CGACCACCTC GCCCACGGCC GCACCGGCTG GCTCGCGAGC 3000
ACGGACACCA CCGACCCCGA GGGCCGCACC GCGGAATCA TCGACGTCGT CCGCGGCCTG 3060
TGGGACAGCT TCGACGACGA CGCCTTCGTC CACGACCGCG CCGACGGCCT GTACTGGCGG 3120
CTGCCCCCGG TCCACCAACT CGACCACCAG GGCAGGCACT TCGACGTGGC CGGCCCCCTC 3180
AACGTCGCCC GCCCGCCGCA GGGCCACCCC GTCGTCGCGG TCACCGGCCC CGCCCTCGCC 3240
GCGGCCGCGG ACCTCGTCCT GCTCGACGAG GCGGCCGACG CCGCCTCGGT GAAGCAGCAG 3300
GCACCGCACG CCAAGATCCT CCTGCCGCTG CCCGGCCCCG CCGCCGAAT GCGCCGCGAC 3360
AGCCCCGCGG ACGGCTTCAC GGTGGCGCTC ACCGGCTCCG ACGACCCGGT CCTGGCCGCG 3420
CTCGCCGCCC GGCCCGGCCG CCCGGACCGC ACCGCGGCCA CCACCCTGCG CGAACGCCTG 3480
GGCCTGGCCC GCCCGAGAG CCGCCACGCC CTCACCACCG CCTGACGACC CGTCCGCCCCG 3540
CTGCTTCCTG GAGAGTCATG TCCCGTCGCC TGTTACCTC GGAGTCCGTG ACCGAGGGCC 3600
ACCCCGACAA GATCGCCGAC CAGATCAGTG ACACCGTCCT CGACGCCCTG CTGCGCGAGG 3660
ACCCCGCCTC ACGCGTCGCG GTCGAGACCC TGATCACCAC CGGCCAGGTC CACATCGCCG 3720
GCGAGGTCAC CACCAAGGCG TACGCGCCCA TCGCCCAACT GTCCGCGAC ACGATCCTGG 3780
CCATCGGCTA CGACTCGTCC GCCAAGGGCT TCGACGGCGC CTCCTGCGGC GTCTCCGTCT 3840
CCATCGGCGC GCAGTCCCCG GACATCGCCC AGGGCGTCGA CAGCGCCTAC GAGACCCGCG 3900
TCGAGGGCGA GGACGACGAG CTCGACCAGC AGGGCGCCGG CGACCAGGGC CTGATGTTTCG 3960
GCTACGCCAC CGACGAGACC CCCTCGCTGA TGCCGCTGCC CATCGAGCTC GCCCACC GCC 4020
TCTCGCGCCG GCTCACCAGG GTCCGCAAGG ACGGCACCGT CCCCTACCTG CGCCCCGACG 4080
GCAAGACCCA GGTCACCATC GAGTACCAGG GCAGCCGCC GGTGCGCCTG GACACCGTCG 4140
TCGTCTCCTC CCAGCACGCC GCCGACATCG ACCTCGGCTC CCTGCTCACC CCCGACATCC 4200
GCGAGCACGT CGTCGAGCAC GTCTCGCCG CACTCGCCGA GGACGGCATC AAGCTCGAGA 4260
CGGACAACTA CCGCCTGCTG GTCAACCCGA CCGGCCGTTT CGAGATCGGC GGCCCGATGG 4320

```

GCGACGCCGG CCTGACCGGC CGCAAGATCA TCATCGACAC GTACGGCGGC ATGGCCCGCC 4380
ACGGCGGTGG CGCGTTCTCC GGCAAGGACC CGTCCAAGGT CGACCGTTCC GCCGCGTACG 4440
CGATGCGCTG GGTCGCCAAG AACGTCGTCG CCGCGGGCCT CGCCTCCCGC TCGGAGGTCC 4500
AGGTCGCCTA CGCCATCGGC AAGGCCGAGC CGGTCGGCCT GTTCGTCGAG ACGTTCGGCA 4560
CCGGCACCCT CGCCCAGGAG CGCATCGAGA AGGCCATCAC CGAGGTCTTC GACCTGCGCC 4620
CCGCGGCCAT CATCCGCGAC CTCGACCTGC TCGGGCCCAT CTACGCCGCC ACCGCCGCCT 4680
ACGGCCACTT CGGCCGCGAA CTGCCCAGCT TCACCTGGGA GCGGACCGAC CGCGCCCACC 4740
GGCTCAAGGC CGCGGCCGGT CTCTGAGCCG GCCGGACCTG TGAGGAGACC TGACGTGCGC 4800
ATCGCTGTCA CCGGTTCCAT CGCCACCGAC CATCTGATGG TCTTCCCCGG CCGGTTGCGG 4860
GATCAGCTGA TCCCCGACCA GCTCGCTCAT GTCTCGCTCT CCTTCCTGGT CGACGCACTC 4920
GAGGTGCGCC GGGGCGGAGT GCGGACAAC GTCGCCTTCG GCCTCGGCGG CCTCGGCCTC 4980
ACCCCCCAGC TGGTCGGCGC CGTGGGCAGC GACTTCGCCG AGTACGAGGT CTGGCTCAAG 5040
GAACACGGCG TCGACACCGG CCCCCTCCTG GTCTCCACCG AGCGGCAGAC CGCCCGGTTT 5100
ATGTGCATCA CCGACCAGGA CTCCAACCAG ATCGCCTCCT TCTACGCGGG CGCCATGCAA 5160
GAGGCCCGCG ACATCGACCT GTGGCACCTG ACCACCGGCA GCGTCCGCCC CGACCTCGTC 5220
CTGGTCTGCC CGAACGACCC GCGGGCGATG CTGCGCCACA CGGGGAGTGC CGCGAAACTG 5280
GGCCTGCCGT TCGCCGCCGA CCCCTCCCAG CAGCTCGCCG GCCTGGAGGG AGGGAGGTAC 5340
CGGAACTCGG TCGACGGGGC CCGTTGGTTT TTCACCAACG AAGTACGAGG CC 5392

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1269 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 1..1269

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

ATG ACC GCA CCC CGC CGG CGC ATC ACC CTC GCC GGC ATC ATC GAC GGC 48

```

102

Met	Thr	Ala	Pro	Arg	Arg	Arg	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Asp	Gly	
1				5					10					15		
CCC	GGC	GGC	CAT	GTG	GCC	GCC	TGG	CGC	CAC	CCG	GCG	ACC	AAG	GCG	GAC	96
Pro	Gly	Gly	His	Val	Ala	Ala	Trp	Arg	His	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Asp	
			20					25					30			
GCC	CAG	CTC	GAC	TTC	GAA	TTC	CAC	CGC	GAC	AAC	GCC	CGC	ACC	CTC	GAA	144
Ala	Gln	Leu	Asp	Phe	Glu	Phe	His	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	
		35					40					45				
CGC	GGC	CTG	TTC	GAC	GCC	GTG	TTC	ATC	GCG	GAC	ATC	GTC	GCC	GTG	TGG	192
Arg	Gly	Leu	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Ile	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Val	Trp	
	50					55					60					
GGC	ACC	CGC	CTG	GAC	TCC	CTG	TGC	CGC	ACC	TCG	CGC	ACC	GAG	CAC	TTC	240
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Leu	Cys	Arg	Thr	Ser	Arg	Thr	Glu	His	Phe	
	65				70				75						80	
GAA	CCG	CTC	ACC	CTG	CTC	GCC	GCC	TAC	GCC	GCG	GTC	ACC	GAG	CAC	ATC	288
Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Val	Thr	Glu	His	Ile	
				85				90						95		
GGC	CTG	TGC	GCC	ACC	GCC	ACC	ACC	ACG	TAC	AAC	GAA	CCG	GCG	CAC	ATC	336
Gly	Leu	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Tyr	Asn	Glu	Pro	Ala	His	Ile	
			100					105					110			
GCC	GCC	CGC	TTC	GCC	TCC	CTC	GAC	CAC	CTC	AGC	GGC	GGC	CGG	GCC	GGC	384
Ala	Ala	Arg	Phe	Ala	Ser	Leu	Asp	His	Leu	Ser	Gly	Gly	Arg	Ala	Gly	
		115					120					125				
TGG	AAC	GTC	GTC	ACC	TCC	GCC	GCA	CCG	TGG	GAG	TCC	GCC	AAC	TTC	GGC	432
Trp	Asn	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Trp	Glu	Ser	Ala	Asn	Phe	Gly	
	130					135					140					
TTC	CCC	GAG	CAC	CTG	GAG	CAC	GGC	AAA	CGC	TAC	GAG	CGG	GCC	GAG	GAG	480
Phe	Pro	Glu	His	Leu	Glu	His	Gly	Lys	Arg	Tyr	Glu	Arg	Ala	Glu	Glu	
	145				150				155						160	
TTC	ATC	GAC	GTC	GTC	AAA	AAA	CTG	TGG	GAC	AGC	GAC	GGC	CGC	CCC	GTC	528
Phe	Ile	Asp	Val	Val	Lys	Lys	Leu	Trp	Asp	Ser	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	
				165					170					175		
GAC	CAC	CGC	GGC	ACC	CAC	TTC	GAG	GCC	CCC	GGC	CCG	CTC	GGG	ATC	GCC	576
Asp	His	Arg	Gly	Thr	His	Phe	Glu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Ile	Ala	
			180					185					190			
CGC	CCC	CCG	CAG	GGC	CGC	CCC	GTC	ATC	ATC	CAG	GCC	GGC	TCC	TCG	CCG	624
Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Pro	Val	Ile	Ile	Gln	Ala	Gly	Ser	Ser	Pro	
		195					200					205				
GTG	GGA	CGC	GAG	TTC	GCC	GCC	CGG	CAC	GCC	GAG	GTC	ATC	TTC	ACC	CGG	672
Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Ala	Arg	His	Ala	Glu	Val	Ile	Phe	Thr	Arg	
	210					215					220					
CAC	AAC	CGG	CTC	TCC	GAC	GCC	CAG	GAC	TTC	TAC	GGC	GAC	CTC	AAG	GCA	720
His	Asn	Arg	Leu	Ser	Asp	Ala	Gln	Asp	Phe	Tyr	Gly	Asp	Leu	Lys	Ala	
	225				230				235						240	
CGC	GTC	GCC	CGG	CAC	GGC	CGC	GAC	CCC	GAG	AAG	GTC	CTC	GTG	TGG	CCG	768
Arg	Val	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Lys	Val	Leu	Val	Trp	Pro	
				245					250					255		

ACC CTC GCG CCG ATC GTC GCC GCC ACC GAC ACC GAG GCG AAG CAG CGC Thr Leu Ala Pro Ile Val Ala Ala Thr Asp Thr Glu Ala Lys Gln Arg 260 265 270	816
CTG CAG GAA CTG CAG GAC CTC ACC CAC GAC CAT GTC GCC CTG CGC ACC Leu Gln Glu Leu Gln Asp Leu Thr His Asp His Val Ala Leu Arg Thr 275 280 285	864
CTT CAG GAC CAC CTC GGC GAC GTC GAC CTG AGC GCG TAC CCG ATC GAC Leu Gln Asp His Leu Gly Asp Val Asp Leu Ser Ala Tyr Pro Ile Asp 290 295 300	912
GGG CCC GTC CCC GAC ATC CCG TAC ACC AAC CAG TCC CAG TCG ACG ACC Gly Pro Val Pro Asp Ile Pro Tyr Thr Asn Gln Ser Gln Ser Thr Thr 305 310 315 320	960
GAG CGG CTG ATC GGC CTG GCC AGG CGC GAG AAC CTC AGC ATC CGC GAG Glu Arg Leu Ile Gly Leu Ala Arg Arg Glu Asn Leu Ser Ile Arg Glu 325 330 335	1008
CTG GCC CTG CGG CTG ATG GGC GAC ATC GTC GTC GGC ACA CCG GAG CAG Leu Ala Leu Arg Leu Met Gly Asp Ile Val Val Gly Thr Pro Glu Gln 340 345 350	1056
CTC GCC GAC CAC ATG GAG AGC TGG TTC ACC GGC CGC GGC GCC GAC GGC Leu Ala Asp His Met Glu Ser Trp Phe Thr Gly Arg Gly Ala Asp Gly 355 360 365	1104
TTC AAC ATC GAC TTC CCG TAC CTG CCG GGC TCC GCC GAC GAC TTC GTC Phe Asn Ile Asp Phe Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Ala Asp Asp Phe Val 370 375 380	1152
GAC CAC GTG GTG CCC GAA CTG CAG CGC CGC GGC CTG TAC CGC TCG GGC Asp His Val Val Pro Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly 385 390 395 400	1200
TAC GAG GGC ACC ACC CTG CGG GCC AAC CTC GGC ATC GAC GCC CCC CGG Tyr Glu Gly Thr Thr Leu Arg Ala Asn Leu Gly Ile Asp Ala Pro Arg 405 410 415	1248
AAG GCA GGT GCA GCG GCT TG Lys Ala Gly Ala Ala Ala 420	1269

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 834 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..834

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG ACC GCG CCC ATC CTC GTC GCC ACC CTC GAC ACC CGC GGC CCG GCC	48
Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala	
1 5 10 15	
GCC ACC CTC GGC ACG ATC ACC CGC GCC GTG CGG GCC GCG GAG GCC GCC	96
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala	
20 25 30	
GGA TTC GAC GCC GTC CTG ATC GAC GAC CGG GCC GCC GCC GGC GTC CAG	144
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Ala Gly Val Gln	
35 40 45	
GGC CGG TTC GAG ACG ACG ACG CTG ACC GCC GCG CTG GCC GCC GTC ACC	192
Gly Arg Phe Glu Thr Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Val Thr	
50 55 60	
GAG CAC ATC GGC CTG ATC ACC GCC CCG CTC CCG GCC GAC CAG GCC CCC	240
Glu His Ile Gly Leu Ile Thr Ala Pro Leu Pro Ala Asp Gln Ala Pro	
65 70 75 80	
TAC CAC GTG TCC CGG ATC ACC GCC TCG CTC GAC CAC CTC GCC CAC GGC	288
Tyr His Val Ser Arg Ile Thr Ala Ser Leu Asp His Leu Ala His Gly	
85 90 95	
CGC ACC GGC TGG CTC GCG AGC ACG GAC ACC ACC GAC CCC GAG GGC CGC	336
Arg Thr Gly Trp Leu Ala Ser Thr Asp Thr Thr Asp Pro Glu Gly Arg	
100 105 110	
ACC GGC GAA CTC ATC GAC GTC GTC CGC GGC CTG TGG GAC AGC TTC GAC	384
Thr Gly Glu Leu Ile Asp Val Val Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Asp	
115 120 125	
GAC GAC GCC TTC GTC CAC GAC CGC GCC GAC GGC CTG TAC TGG CGG CTG	432
Asp Asp Ala Phe Val His Asp Arg Ala Asp Gly Leu Tyr Trp Arg Leu	
130 135 140	
CCC GCC GTC CAC CAA CTC GAC CAC CAG GGC AGG CAC TTC GAC GTG GCC	480
Pro Ala Val His Gln Leu Asp His Gln Gly Arg His Phe Asp Val Ala	
145 150 155 160	
GGC CCC CTC AAC GTC GCC CGC CCG CCG CAG GGC CAC CCC GTC GTC GCC	528
Gly Pro Leu Asn Val Ala Arg Pro Pro Gln Gly His Pro Val Val Ala	
165 170 175	
GTC ACC GGC CCC GCC CTC GCC GCG GCC GCC GAC CTC GTC CTG CTC GAC	576
Val Thr Gly Pro Ala Leu Ala Ala Ala Asp Leu Val Leu Leu Asp	
180 185 190	
GAG GCG GCC GAC GCC GCC TCG GTG AAG CAG CAG GCA CCG CAC GCC AAG	624
Glu Ala Ala Asp Ala Ala Ser Val Lys Gln Gln Ala Pro His Ala Lys	
195 200 205	
ATC CTC CTG CCG CTG CCC GGC CCG GCC GCC GAA CTG CCC GCC GAC AGC	672
Ile Leu Leu Pro Leu Pro Gly Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Asp Ser	
210 215 220	
CCC GCG GAC GGC TTC ACG GTG GCG CTC ACC GGC TCC GAC GAC CCG GTC	720

105

Pro	Ala	Asp	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Pro	Val		
225					230					235					240		
CTG	GCC	GCG	CTC	GCC	GCC	CGG	CCC	GGC	CGC	CCG	GAC	CGC	ACC	GCG	GCC		768
Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Asp	Arg	Thr	Ala	Ala		
				245					250					255			
ACC	ACC	CTG	CGC	GAA	CGC	CTG	GGC	CTG	GCC	CGC	CCC	GAG	AGC	CGC	CAC		816
Thr	Thr	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Pro	Glu	Ser	Arg	His		
			260					265					270				
GCC	CTC	ACC	ACC	GCC	TG												834
Ala	Leu	Thr	Thr	Ala													
			275														

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1209 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 1..1209

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATG	TCC	CGT	CGC	CTG	TTC	ACC	TCG	GAG	TCC	GTG	ACC	GAG	GGC	CAC	CCC		48
Met	Ser	Arg	Arg	Leu	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	His	Pro		
1				5				10					15				
GAC	AAG	ATC	GCC	GAC	CAG	ATC	AGT	GAC	ACC	GTC	CTC	GAC	GCC	CTG	CTG		96
Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Leu	Leu		
			20					25					30				
CGC	GAG	GAC	CCC	GCC	TCA	CGC	GTC	GCG	GTC	GAG	ACC	CTG	ATC	ACC	ACC		144
Arg	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Thr	Leu	Ile	Thr	Thr		
			35				40					45					
GGC	CAG	GTC	CAC	ATC	GCC	GGC	GAG	GTC	ACC	ACC	AAG	GCG	TAC	GCG	CCC		192
Gly	Gln	Val	His	Ile	Ala	Gly	Glu	Val	Thr	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Pro		
	50					55					60						
ATC	GCC	CAA	CTG	GTC	CGC	GAC	ACG	ATC	CTG	GCC	ATC	GGC	TAC	GAC	TCG		240
Ile	Ala	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Thr	Ile	Leu	Ala	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ser		
	65				70				75						80		
TCC	GCC	AAG	GGC	TTC	GAC	GGC	GCC	TCC	TGC	GGC	GTC	TCC	GTC	TCC	ATC		288
Ser	Ala	Lys	Gly	Phe	Asp	Gly	Ala	Ser	Cys	Gly	Val	Ser	Val	Ser	Ile		
			85					90						95			

106

GGC GCG CAG TCC CCG GAC ATC GCC CAG GGC GTC GAC AGC GCC TAC GAG Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu 100 105 110	336
ACC CGC GTC GAG GGC GAG GAC GAC GAG CTC GAC CAG CAG GGC GCC GGC Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly 115 120 125	384
GAC CAG GGC CTG ATG TTC GGC TAC GCC ACC GAC GAG ACC CCC TCG CTG Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu 130 135 140	432
ATG CCG CTG CCC ATC GAG CTC GCC CAC CGC CTC TCG CGC CGG CTC ACC Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr 145 150 155 160	480
GAG GTC CGC AAG GAC GGC ACC GTC CCC TAC CTG CGC CCC GAC GGC AAG Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys 165 170 175	528
ACC CAG GTC ACC ATC GAG TAC CAG GGC AGC CGC CCG GTG CGC CTG GAC Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp 180 185 190	576
ACC GTC GTC GTC TCC TCC CAG CAC GCC GCC GAC ATC GAC CTC GGC TCC Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser 195 200 205	624
CTG CTC ACC CCC GAC ATC CGC GAG CAC GTC GTC GAG CAC GTC CTC GCC Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala 210 215 220	672
GCA CTC GCC GAG GAC GGC ATC AAG CTC GAG ACG GAC AAC TAC CGC CTG Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu 225 230 235 240	720
CTG GTC AAC CCG ACC GGC CGT TTC GAG ATC GGC GGC CCG ATG GGC GAC Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp 245 250 255	768
GCC GGC CTG ACC GGC CGC AAG ATC ATC ATC GAC ACG TAC GGC GGC ATG Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met 260 265 270	816
GCC CGC CAC GGC GGT GGC GCG TTC TCC GGC AAG GAC CCG TCC AAG GTC Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val 275 280 285	864
GAC CGT TCC GCC GCG TAC GCG ATG CGC TGG GTC GCC AAG AAC GTC GTC Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val 290 295 300	912
GCC GCG GGC CTC GCC TCC CGC TGC GAG GTC CAG GTC GCC TAC GCC ATC Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile 305 310 315 320	960
GGC AAG GCC GAG CCG GTC GGC CTG TTC GTC GAG ACG TTC GGC ACC GGC Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly 325 330 335	1008
ACC GTC GCC CAG GAG CGC ATC GAG AAG GCC ATC ACC GAG GTC TTC GAC Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp	1056

107

	340	345	350	
CTG CGC CCC GCG GCC ATC ATC CGC GAC CTC GAC CTG CTG CGG CCC ATC				1104
Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu Leu Arg Pro Ile				
	355	360	365	
TAC GCC GCC ACC GCC GCC TAC GGC CAC TTC GGC CGC GAA CTG CCG GAC				1152
Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp				
	370	375	380	
TTC ACC TGG GAG CGG ACC GAC CGC GCC CAC CGG CTC AAG GCC GCG GCC				1200
Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala				
	385	390	395	400
GGT CTC TG				1209
Gly Leu				

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1879 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMLACEMENT: 110..1858

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GATCGGCTCC TGACGGAGCG GCGGCGCGCG GGCGCGGCGC ATCAGCGGCG TGTCAACGGC	60
GCTGCCGACA CTGGGCGCGA CGCGAGGACG AAGCCGGAAA GGACCAACG ATG CTG	115
	Met Leu
	1
GAC GGA TGC GTT CCC TGG CCC GAG GAT GTG GCC GCG AAG TAC CGG GCG	163
Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr Arg Ala	
	5 10 15
GCC GGC TAC TGG CGG GGC GAG CCG CTG GGC ATG CTG CTG GGC CGC TGG	211
Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly Arg Trp	
	20 25 30
GCG GAG CAG TAC GGC GAG CGG GAG GCG CTG GTC GGC GCG GAC GGG TGC	259
Ala Glu Gln Tyr Gly Glu Arg Glu Ala Leu Val Gly Ala Asp Gly Cys	
	35 40 45 50
TCC CGT GTC ACC TAC CGT GCC CTG GAC CGC TGG TGC GAC CGG CTG GCG	307
Ser Arg Val Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Arg Trp Cys Asp Arg Leu Ala	
	55 60 65

GCG GGG TTC GCG GCG CGC GGG ATC GGC GCC GGC GAG CGG GTG CTG GTG Ala Gly Phe Ala Ala Arg Gly Ile Gly Ala Gly Glu Arg Val Leu Val	355
70 75 80	
CAG CTG CCG AAC ACG CCC GAG TTC GTC GCG GTG TGC TTC GCG CTG TTC Gln Leu Pro Asn Thr Pro Glu Phe Val Ala Val Cys Phe Ala Leu Phe	403
85 90 95	
CGT CTG GGC GCG CTG CCG GTG TTC GCG CTG CCC GCG CAC CGT GCC GCC Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Ala Ala	451
100 105 110	
GAG GTG GGG CAC CTG CTC GAG CTG TCC GGC GCC GTC GCC CAC ATC CTG Glu Val Gly His Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ala Val Ala His Ile Leu	499
115 120 125 130	
CCG GGC ACC GGC ACC GGC TAC GAC CAT GTC GCG GCG GCC GTG GAG GCC Pro Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Asp His Val Ala Ala Ala Val Glu Ala	547
135 140 145	
CGT GCC CGC CGT GCC CGC CCG GTG CAG GTG TTC GTG GCG GGC GAG GCG Arg Ala Arg Arg Ala Arg Pro Val Gln Val Phe Val Ala Gly Glu Ala	595
150 155 160	
CCC GCG GTG CTG CCC GAG GGG TTC ACC GCG CTG GCC GAC GTG GAC GGC Pro Ala Val Leu Pro Glu Gly Phe Thr Ala Leu Ala Asp Val Asp Gly	643
165 170 175	
GAC CCG GTG GCG CCG GCG GAC GTG GAC GCC TTC CGA CGT GGC GTC TTC Asp Pro Val Ala Pro Ala Asp Val Asp Ala Phe Arg Arg Gly Val Phe	691
180 185 190	
CTG CTG TCC GGG GGG ACG ACC GCG CTG CCG AAG CTG ATC CCG CGC ACC Leu Leu Ser Gly Gly Thr Thr Ala Leu Pro Lys Leu Ile Pro Arg Thr	739
195 200 205 210	
CAC GAC GAC TAC GCC TAC CAG TGC CGG GTC ACG GCC GGT ATC TGC GGC His Asp Asp Tyr Ala Tyr Gln Cys Arg Val Thr Ala Gly Ile Cys Gly	787
215 220 225	
CTG GAC GCG GAC AGT GTC TAT CTG GCG GTG CTG CCG GCC GAG TTC AAC Leu Asp Ala Asp Ser Val Tyr Leu Ala Val Leu Pro Ala Glu Phe Asn	835
230 235 240	
TTC CCC TTC GGC TGC CCG GGC ATC CTG GGC ACC CTG CAC GCC GGC GGG Phe Pro Phe Gly Cys Pro Gly Ile Leu Gly Thr Leu His Ala Gly Gly	883
245 250 255	
CGG GTG GTG TTC GCG CTG TCA CCG CAG CCC GAG GAG TGC TTC GCG CTG Arg Val Val Phe Ala Leu Ser Pro Gln Pro Glu Glu Cys Phe Ala Leu	931
260 265 270	
ATC GAA CGC GAA CAC GTC ACC TTC ACC TCC GTC ATC CCC ACG ATC GTG Ile Glu Arg Glu His Val Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Ile Val	979
275 280 285 290	
CAC CTG TGG CTG GCG GCC GCC GCA CAA GGC CAC GGC CGC GAC CTG GGC His Leu Trp Leu Ala Ala Ala Gln Gly His Gly Arg Asp Leu Gly	1027
295 300 305	
AGC CTT CAG CTG CTG CAG GTC GGC AGC GCC AAA CTC CAC GAG GAG CTC Ser Leu Gln Leu Leu Gln Val Gly Ser Ala Lys Leu His Glu Glu Leu	1075

310	315	320	
GCC GCC CGG ATC GGC CCC GAA CTG Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu	GGG GTG CGG CTG CAG CAG GTG TTC Gly Val Arg Leu Gln Gln Val Phe		1123
325	330	335	
GGC ATG GCC GAG GGA CTG CTG ACC TTC ACC CGC GAC GAC GAC CCG GCG Gly Met Ala Glu Gly Leu Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp Pro Ala			1171
340	345	350	
GAC GTG GTG CTG CGC ACC CAG GGC CGG CCG GTG TCC GAG GCC GAC GAG Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala Asp Glu			1219
355	360	365	370
ATA CGC GTC GCC GAC CCC GAC GGC CGG CCC GTG CCC CGC GGT GAG ACC Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly Glu Thr			1267
375	380	385	
GGT GAA CTG CTC ACC CGC GGC CCC TAC ACG CTG CGC GGC TAC TAC CGG Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Arg			1315
390	395	400	
GCC CCC GAG CAC AAC GCC CGC GCG TTC ACC GAG GAC GGC TTC TAC CGC Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe Tyr Arg			1363
405	410	415	
AGC GGC GAT CTG GTG CGG CTC ACC GCC GAC GGG CAG TTG GTG GTG GAG Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val Val Glu			1411
420	425	430	
GGC AGG ATC AAG GAC GTC GTC ATC CGC GGC GGC GAC AAG GTC TCC GCG Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Gly Asp Lys Val Ser Ala			1459
435	440	445	450
ACC GAG GTC GAG GGC CAC CTG GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GCC Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln Gln Ala			1507
455	460	465	
GCC GTC GTC GCC ATG CCC GAC CCG GTG TGG GGC GAG AAG GTC TGC GCC Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val Cys Ala			1555
470	475	480	
TAC ATC GTG CCC GCA CCC GGC CGT CCC GCA CCG CCG ATG GCG GCG CTG Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala Ala Leu			1603
485	490	495	
CGC CGG CTG CTG CGC GCG CGG GGA CTG GCC GAC TAC AAG CTT CCC GAC Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu Pro Asp			1651
500	505	510	
CGG GTG GAG GTC GTC GAC GCG TTC CCG CTG ACC GGC CTC AAC AAG GTC Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn Lys Val			1699
515	520	525	530
GAC AAG AAG GCC CTG GCG GCC GAC ATC GCC GCC AAG ACC GCC CCC ACC Asp Lys Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala Pro Thr			1747
535	540	545	
CGC CCC ACC ACC GCC GGC CAC GGC CCG ACC ACG GAC GGC GAT ACG GCC Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp Thr Ala			1795
550	555	560	
GGT GGG GGT GGG TCC GCG GGC GGG GTG ACG GCC GCC GGT GGC GGG CGG			1843

110

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly Gly Arg
 565 570 575

GAG GAG GCG GCG TGAGCGGGCC CGGGCCCGAG GGCG
 Glu Glu Ala Ala
 580

1879

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1833 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Streptomyces pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 103..1689

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGATCCCCTC GCCCAGGGCC CTGGCGGGCC CGCCGGGGCCG TGGGGGAGGT GCGGGGGCCG 60
 CGGGCCCCCG CACCGCACGA ACAGAACAAC CGCTCCGGGC CC ATG CGG ACT TCA 114
 Met Arg Thr Ser
 1
 CGG TCC CAC GAC CAG CGG GCC CCT ACC CCC TGG AGA CAT CCC TTG CAC 162
 Arg Ser His Asp Gln Arg Ala Pro Thr Pro Trp Arg His Pro Leu His
 5 10 15 20
 AGC ACC CGG CCC GCG CCC GCG GCC GAC CGT GAC CCC AGG CGC TGG GTC 210
 Ser Thr Arg Pro Ala Pro Ala Ala Asp Arg Asp Pro Arg Arg Trp Val
 25 30 35
 ATC CTC GGC GTG ATC TGC CTG GCC CAA CTC GTC GTC CTG CTC GAC AAC 258
 Ile Leu Gly Val Ile Cys Leu Ala Gln Leu Val Val Leu Leu Asp Asn
 40 45 50
 ACC GTC CTC AAC GTC GCC ATC CCG GTG CTC ACC ACC GAC CTG GGC GCC 306
 Thr Val Leu Asn Val Ala Ile Pro Val Leu Thr Thr Asp Leu Gly Ala
 55 60 65
 AGC ACC GCC GAC ATC CAG TGG ATG ATC AAC GCC TAC GCG CTC GTG CAG 354
 Ser Thr Ala Asp Ile Gln Trp Met Ile Asn Ala Tyr Ala Leu Val Gln
 70 75 80
 TCC GGG CTG CTG CTC ACC GCG GGC AGC CTC GCG GAC CGC TAC GGC CGC 402
 Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ser Leu Ala Asp Arg Tyr Gly Arg
 85 90 95 100
 AAA CGG CTG CTG ATG CTC GGA CTG GTG CTC TTC GGC GCC GGG TCC GCC 450

111

Lys	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Ala	Gly	Ser	Ala	
				105					110					115		
TGG	GCG	GCC	TTC	GCC	CAG	GAC	TCC	GCC	CAA	CTC	ATC	GCC	GCC	CGG	GCC	498
Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Gln	Leu	Ile	Ala	Ala	Arg	Ala	
			120					125					130			
GGC	ATG	GGC	GTG	GCC	GGG	GCG	CTG	CTG	GCG	ACC	ACC	ACC	CTC	GCC	GTC	546
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Val	
			135				140						145			
ATC	ATG	CAG	GTC	TTC	GAC	GAC	GAC	GAA	CGC	CCC	CGG	GCG	ATC	GGC	CTG	594
Ile	Met	Gln	Val	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu	Arg	Pro	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	
	150					155					160					
TGG	GGA	GCG	GCC	AGC	TCA	CTG	GGC	TTC	GCG	GCC	GGC	CCG	CTG	CTC	GGC	642
Trp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	
	165				170				175						180	
GGC	GCC	CTC	CTC	GAC	CAC	TTC	TGG	TGG	GGC	TCC	ATC	TTC	CTG	ATC	AAC	690
Gly	Ala	Leu	Leu	Asp	His	Phe	Trp	Trp	Gly	Ser	Ile	Phe	Leu	Ile	Asn	
				185					190					195		
CTG	CCC	GTC	GCG	CTG	CTG	GGC	CTG	CTG	GCC	GTC	GCC	CGC	CTG	GTG	CCC	738
Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Val	Pro	
			200				205						210			
GAG	ACG	AAG	AAC	CCC	GAA	GGC	CGG	CGC	CCC	GAC	CTG	CTC	GGC	GCC	GTG	786
Glu	Thr	Lys	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	
		215					220					225				
CTC	TCC	ACC	CTC	GGC	ATG	GTC	GGC	GTC	GTC	TAC	GCC	ATC	ATC	TCC	GGC	834
Leu	Ser	Thr	Leu	Gly	Met	Val	Gly	Val	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	
			230			235					240					
CCC	GAA	CAC	GGC	TGG	ACG	GCC	CCG	CAG	GTC	CTC	CTG	CCG	GCC	GCC	GTC	882
Pro	Glu	His	Gly	Trp	Thr	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	
	245				250					255					260	
GCG	GCC	GCC	GCG	CTC	ACC	GCG	TTC	GTC	CGC	TGG	GAA	CTG	CAC	ACC	CCC	930
Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Arg	Trp	Glu	Leu	His	Thr	Pro	
				265				270						275		
CAC	CCC	ATG	CTC	GAC	ATG	GGC	TTC	TTC	ACC	GAC	CGG	CGC	TTC	AAC	GGG	978
His	Pro	Met	Leu	Asp	Met	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	Arg	Arg	Phe	Asn	Gly	
			280				285						290			
CCG	TCG	CCG	GCG	GAG	TGC	TCG	TCG	TTC	GGC	ATG	GCC	GGC	TCG	CTC	TTC	1026
Pro	Ser	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	
		295					300					305				
CTG	CTC	ACC	CAG	CAC	CTC	CAA	CTC	GTC	CTC	GGC	TAC	GAC	GCC	CTG	CAG	1074
Leu	Leu	Thr	Gln	His	Leu	Gln	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Gln	
		310				315					320					
GCC	GGC	CTG	CGC	ACC	GCG	CCA	CTG	GCT	TTG	ACG	ATC	GTC	GCC	CTC	AAC	1122
Ala	Gly	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	
	325				330					335					340	
CTG	GCC	GGC	CTC	GGC	GCG	AAA	CTC	CTC	GCC	GCG	CTC	GGC	ACC	GCC	CGC	1170
Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Arg	
				345					350					355		

112

AGC ATC GCC CTG GGC ATG ACA CTG CTG GCC GCC GGC CTC AGC GCG GTG	1218
Ser Ile Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Ala Ala Gly Leu Ser Ala Val	
360 365 370	
GCC GTC GGC GGA TCG GGC CCC GAC GCC GGC TAC GGC GGC ATG CTC GCC	1266
Ala Val Gly Gly Ser Gly Pro Asp Ala Gly Tyr Gly Gly Met Leu Ala	
375 380 385	
GGC CTG CTC CTC ATG GGC GCG GGC ATC GCA CTG GCC ATG CCC GCC ATG	1314
Gly Leu Leu Leu Met Gly Ala Gly Ile Ala Leu Ala Met Pro Ala Met	
390 395 400	
GCC ACC GCC GTG ATG TCC TCC ATC CCG CCC GCC AAG GCC GGG GCC GGA	1362
Ala Thr Ala Val Met Ser Ser Ile Pro Pro Ala Lys Ala Gly Ala Gly	
405 410 415 420	
GCG GGC GTG CAG GGC ACC CTG ACC GAG TTC GGC GGC GGA CTG GGA GTG	1410
Ala Gly Val Gln Gly Thr Leu Thr Glu Phe Gly Gly Gly Leu Gly Val	
425 430 435	
GCG ATC CTC GGC GCC GTC CTC GGC TCC CGC TTC GCC TCC CAA CTG CCC	1458
Ala Ile Leu Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Phe Ala Ser Gln Leu Pro	
440 445 450	
GCC GCC ATC ACC GGC ACC GGC TCC CTC GAC GAG GCA CTG CGC GAC GCC	1506
Ala Ala Ile Thr Gly Thr Gly Ser Leu Asp Glu Ala Leu Arg Asp Ala	
455 460 465	
ACA CCC CAA CAG GCC GGG CAG GTC CAC GAC GCG TTC GCC GAC GCG GTG	1554
Thr Pro Gln Gln Ala Gly Gln Val His Asp Ala Phe Ala Asp Ala Val	
470 475 480	
AAC ACC AGC CAA CTC ATC GGC GCC GCC GCC GTG TTC ACC GGC GGC CTG	1602
Asn Thr Ser Gln Leu Ile Gly Ala Ala Ala Val Phe Thr Gly Gly Leu	
485 490 495 500	
CTC GCC GCG CTG CTG CTG CAC CGC GCC GAC CGC AAG GCC GCC CCC CAG	1650
Leu Ala Ala Leu Leu Leu His Arg Ala Asp Arg Lys Ala Ala Pro Gln	
505 510 515	
CCC ACC GCC CCC ACC CCC GAA CCC ACC ACC ACC GCC TGACCCCCGG	1696
Pro Thr Ala Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Thr Ala	
520 525	
CCCGCCGGGC ACCACACAAC CCACGGCCCC ACCCCTGCGG CTCCCCACCG GGACCCACAG	1756
GGGCGGGGCC GTGCCGCTGC CCTGCCACAC CACACAGCCC CCACACACAC AGCCCCCGCA	1816
CGGCCGACAG CGCCGGG	1833

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 695 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 640 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..640
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "gene Snad"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GCG ACC GCC CGG CTC ATC GGC CCG CTG CCG CGC CGG CTG GGC CTC CAG	48
Ala Thr Ala Arg Leu Ile Gly Pro Leu Pro Arg Arg Leu Gly Leu Gln	
1 5 10 15	
GTG CAC CAG GTG ATG ACG GGC GCG TTC GCG CAG GCC CTC GCC CGC TGG	96
Val His Gln Val Met Thr Gly Ala Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Trp	
20 25 30	
CGG GGC AGC CGC GCC GTC ACC TTC GAC GTG GAG ACC CAC GGA CGG CAC	144
Arg Gly Ser Arg Ala Val Thr Phe Asp Val Glu Thr His Gly Arg His	
35 40 45	
GGC CGC GAC GAA CTG TTC CGT ACC GTC GGC TGG TTC ACC TCC ATC CAC	192
Gly Arg Asp Glu Leu Phe Arg Thr Val Gly Trp Phe Thr Ser Ile His	
50 55 60	
CCC GTC GTC CTG GGC GCG GAC CGC TCC GTG CAC CCC GAG CAG TAC CTC	240
Pro Val Val Leu Gly Ala Asp Arg Ser Val His Pro Glu Gln Tyr Leu	
65 70 75 80	
GCC CAG ATC GGC GCG GCG CTG ACC GCC GTA CCG GAC GGC GGC GTC GGC	288
Ala Gln Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Val Pro Asp Gly Gly Val Gly	
85 90 95	
TTC GGC GCC TGC CGC GAG TTC TCC CCG GAC GCC GGG CTG CGC ACT CTG	336
Phe Gly Ala Cys Arg Glu Phe Ser Pro Asp Ala Gly Leu Arg Thr Leu	
100 105 110	
CTG CGT GAC CTG CCG CCC GCC CTG GTG TGC TTC AAC TAC TAC GGT CAG	384
Leu Arg Asp Leu Pro Pro Ala Leu Val Cys Phe Asn Tyr Tyr Gly Gln	
115 120 125	
GCC GAC CAG TTG AGC CCG AAC GGC GGT TTC CGT ATG TCG GGC CGT CCC	432
Ala Asp Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Phe Arg Met Ser Gly Arg Pro	
130 135 140	

115

ATC CCG CGC GAG CAC TCC GCC CGC TGC GAG CGC GTC TAC GGC ATC GAG	480
Ile Pro Arg Glu His Ser Ala Arg Cys Glu Arg Val Tyr Gly Ile Glu	
145 150 155 160	
GTG TAC GGC ATC GTC CAC GGC GGC CGC CTG CGC ATG GGC CTG ACC TGG	528
Val Tyr Gly Ile Val His Gly Gly Arg Leu Arg Met Gly Leu Thr Trp	
165 170 175	
GTG CCG AGC CCG GCG GAC GGT GTG GAC GAG GCC GGC GTC GAC GCG CTC	576
Val Pro Ser Pro Ala Asp Gly Val Asp Glu Ala Gly Val Asp Ala Leu	
180 185 190	
GTG GAG CAG ATG AGC TGG GTG CTG GCC ACG CTC GCG GGC GCC GAC CCG	624
Val Glu Gln Met Ser Trp Val Leu Ala Thr Leu Ala Gly Ala Asp Pro	
195 200 205	
CAC GCC GTG ACC CCG G	640
His Ala Val Thr Pro	
210	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 645 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 61..645
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "gene papA"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GGCGTCAAGA ACCTGCCGCT GACCGTACGG CGCGGCTGAC ACAGACAAGG GGGCCACCTG	60
GTG CGC ACC GTG CGA ACC CTG CTG ATC GAC AAC TAC GAC TCG TTC ACC	108
Val Arg Thr Val Arg Thr Leu Leu Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Phe Thr	
1 5 10 15	
TAC AAC CTC TTC CAG ATG CTG GCC GAG GTG AAC GGC GCC GCT CCG CTC	156
Tyr Asn Leu Phe Gln Met Leu Ala Glu Val Asn Gly Ala Ala Pro Leu	
20 25 30	
GTC GTC CGC AAC GAC GAC ACC CGC ACC TGG CAG GCC CTG GCG CCG GGC	204
Val Val Arg Asn Asp Asp Thr Arg Thr Trp Gln Ala Leu Ala Pro Gly	
35 40 45	
GAC TTC GAC AAC GTC GTC GTC TCA CCC GGC CCC GGC CAC CCC GCC ACC	252

116

Asp	Phe	Asp	Asn	Val	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Pro	Ala	Thr	
50						55					60					
GAC	ACC	GAC	CTG	GGC	CTC	AGC	CGC	CGG	GTG	ATC	ACC	GAA	TGG	GAC	CTG	300
Asp	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Arg	Val	Ile	Thr	Glu	Trp	Asp	Leu	
65					70					75					80	
CCG	CTG	CTC	GGG	GTG	TGC	CTG	GGC	CAC	CAG	GCC	CTG	TGC	CTG	CTC	GCC	348
Pro	Leu	Leu	Gly	Val	Cys	Leu	Gly	His	Gln	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	
				85					90						95	
GGC	GCC	GCC	GTC	GTC	CAC	GCA	CCC	GAA	CCC	TTT	CAC	GGC	CGC	ACC	AGC	396
Gly	Ala	Ala	Val	Val	His	Ala	Pro	Glu	Pro	Phe	His	Gly	Arg	Thr	Ser	
			100					105					110			
GAC	ATC	CGC	CAC	GAC	GGG	CAG	GGC	CTG	TTC	GCG	AAC	ATC	CCC	TCC	CCG	444
Asp	Ile	Arg	His	Asp	Gly	Gln	Gly	Leu	Phe	Ala	Asn	Ile	Pro	Ser	Pro	
		115					120					125				
CTG	ACC	GTG	GTC	CGC	TAC	CAC	TCG	CTG	ACC	GTC	CGG	CAA	CTG	CCC	GCC	492
Leu	Thr	Val	Val	Arg	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Pro	Ala	
	130					135					140					
GAC	CTG	CGC	GCC	ACC	GCC	CAC	ACC	GCC	GAC	GGG	CAG	CTG	ATG	GCC	GTC	540
Asp	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	His	Thr	Ala	Asp	Gly	Gln	Leu	Met	Ala	Val	
145					150					155					160	
GCC	CAC	CGC	CAC	CTG	CCC	CGC	TTC	GGC	GTG	CAG	TTC	CAC	CCC	GAA	TCG	588
Ala	His	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Phe	Gly	Val	Gln	Phe	His	Pro	Glu	Ser	
				165					170					175		
ATC	AGC	AGC	GAA	CAC	GGC	CAC	CGG	ATG	CTC	GCC	AAC	TTC	CGC	GAC	CTG	636
Ile	Ser	Ser	Glu	His	Gly	His	Arg	Met	Leu	Ala	Asn	Phe	Arg	Asp	Leu	
			180					185					190			
TCC	CTG	CGC														645
Ser	Leu	Arg														
		195														

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1052 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 84..962
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Gene PapM"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CTCGAGGACG AGTGGATCGC CTCCGGCGGC GCGCCCGTCC CCACGCCCCGT GCACGCGTCC	60
GCGTCCGCGC GGGGGGCCGT GTC GTG ACC GCC GCC GCA CCC ACC CTC GCC	110
Val Thr Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ala	
1 5	
CAG GCG CTG GAC GAG GCC ACC GGG CAG CTG ACC GGC GCC GGG ATC ACC	158
Gln Ala Leu Asp Glu Ala Thr Gly Gln Leu Thr Gly Ala Gly Ile Thr	
10 15 20 25	
GCC GAC GCC GCC CGG GCC GAC ACC CGG CTG CTG GCC GCC CAC GCC TGC	206
Ala Asp Ala Ala Arg Ala Asp Thr Arg Leu Leu Ala Ala His Ala Cys	
30 35 40	
CAG GTC GCC CCG GGG GAC CTC GAC ACC TGC CTG GCC GGC CCG GTG CCG	254
Gln Val Ala Pro Gly Asp Leu Asp Thr Cys Leu Ala Gly Pro Val Pro	
45 50 55	
CCC CGG TTC TGG CAC TAC GTC CGG CGC CGT CTG ACC CGC GAA CCC GCC	302
Pro Arg Phe Trp His Tyr Val Arg Arg Arg Leu Thr Arg Glu Pro Ala	
60 65 70	
GAA CGC ATC GTC GGC CAC GCC TAC TTC ATG GGC CAC CGC TTC GAC CTG	350
Glu Arg Ile Val Gly His Ala Tyr Phe Met Gly His Arg Phe Asp Leu	
75 80 85	
GCC CCC GGC GTC TTC GTC CCC AAA CCC GAG ACC GAG GAG ATC ACC CGG	398
Ala Pro Gly Val Phe Val Pro Lys Pro Glu Thr Glu Glu Ile Thr Arg	
90 95 100 105	
GAC GCC ATC GCC CGC CTG GAG GCC CTC GTC CGC CGC GGC ACC ACC GCA	446
Asp Ala Ile Ala Arg Leu Glu Ala Leu Val Arg Arg Gly Thr Thr Ala	
110 115 120	
CCC CTG GTC GTC GAC CTG TGC GCC GGA CCG GGC ACC ATG GCC GTC ACC	494
Pro Leu Val Val Asp Leu Cys Ala Gly Pro Gly Thr Met Ala Val Thr	
125 130 135	
CTG GCC CGC CAC GTA CCG GCC GCC CGC GTC CTG GGC ATC GAA CTC TCC	542
Leu Ala Arg His Val Pro Ala Ala Arg Val Leu Gly Ile Glu Leu Ser	
140 145 150	
CAG GCC GCC GCC CGC GCC GCC CGG CGC AAC GCC CGC GGC ACC GGC GCC	590
Gln Ala Ala Ala Arg Ala Ala Arg Arg Asn Ala Arg Gly Thr Gly Ala	
155 160 165	
CGC ATC GTG CAG GGC GAC GCC CGC GAC GCC TTC CCC GAA CTG AGC GGC	638
Arg Ile Val Gln Gly Asp Ala Arg Asp Ala Phe Pro Glu Leu Ser Gly	
170 175 180 185	
ACC GTC GAC CTC GTC GTC ACC AAC CCG CCC TAC ATC CCC ATC GGA CTG	686
Thr Val Asp Leu Val Val Thr Asn Pro Pro Tyr Ile Pro Ile Gly Leu	
190 195 200	
CGC ACC TCC GCA CCC GAA GTG CTC GAG CAC GAC CCG CCG CTG GCC CTG	734
Arg Thr Ser Ala Pro Glu Val Leu Glu His Asp Pro Pro Leu Ala Leu	
205 210 215	
TGG GCC GGG GAG GAG GGC CTC GGC ATG ATC CGC GCC ATG GAA CGC ACC	782
Trp Ala Gly Glu Glu Gly Leu Gly Met Ile Arg Ala Met Glu Arg Thr	

118

220	225	230	
GCG GCC CGG CTG CTG GCC CCC GGC GGC GTC CTG CTC CTC GAA CAC GGC Ala Ala Arg Leu Leu Ala Pro Gly Gly Val Leu Leu Leu Glu His Gly 235 240 245			830
TCC TAC CAA CTC GCC TCC GTG CCC GCC CTG TTC CGC GCA ACC GGC CGC Ser Tyr Gln Leu Ala Ser Val Pro Ala Leu Phe Arg Ala Thr Gly Arg 250 255 260 265			878
TGG AGC CAC GCC TCG TCC CGT CCC ACC TGC AAC GAC GGC TGC CTG ACC Trp Ser His Ala Ser Ser Arg Pro Thr Cys Asn Asp Gly Cys Leu Thr 270 275 280			926
GCC GTA CGC AAC CAC ACC TGC GCA CCG CCC GCC TGACACGGCG TCACGGCACG Ala Val Arg Asn His Thr Cys Ala Pro Pro Ala 285 290			979
GCCGGCCTGT CGGCAACGAC CCTACGCCAT TGACAAACCG ACCGTGCCGT TTTTAAATG			1039
TCGGGGTGGC GGA			1052

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 227 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 3..227
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SncC"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AG ATC TTC GAG CAC AAG ACC GTC GCC CAG CTC GCA CCC GTC GCC GAG Ile Phe Glu His Lys Thr Val Ala Gln Leu Ala Pro Val Ala Glu 1 5 10 15	47
ACG CTC GCC GAC ACC ACC CGC GAG GAA CCC GCC GCC GTC GCC GCG ACC Thr Leu Ala Asp Thr Thr Arg Glu Glu Pro Ala Ala Val Ala Ala Thr 20 25 30	95
GGC GAC GTA CCG CTC ACC CCG ATC ATG CAC TGG CTG CGC GAA CGC GGC Gly Asp Val Pro Leu Thr Pro Ile Met His Trp Leu Arg Glu Arg Gly 35 40 45	143
GGC CCC GTC GAC GCG TTC AGC CAG ACG ATG GCC GTC ACC GTC CCC GCC Gly Pro Val Asp Ala Phe Ser Gln Thr Met Ala Val Thr Val Pro Ala 50 55 60	191

GGC CTG GAC CGG GAA CGG CTC GTG GCC GCC CTG CAG 227
Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Val Ala Ala Leu Gln
65 70 75

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 247 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *S. pristinaespiralis*

(1x) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..247
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SnbC"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

[illegible]

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 192 paires de bases,
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

120

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 3..192
 - (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SnbD"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GC ATG CCC CCC GTC ACC CCC TAC CGC GCC TAC CTG GCC CAC CTC GCC	47
Met Pro Pro Val Thr Pro Tyr Arg Ala Tyr Leu Ala His Leu Ala	
1 5 10 15	
GGC CGT GAC GAC GAC GCC GCC CGC GCC GCG TGG CGG ACC GCC CTC GCG	95
Gly Arg Asp Asp Asp Ala Ala Arg Ala Ala Trp Arg Thr Ala Leu Ala	
20 25 30	
GAC CTG GAG GAG CCG AGC CTC GTC GCG GGC GCC GGA GCA GGC CGC GGC	143
Asp Leu Glu Glu Pro Ser Leu Val Ala Gly Ala Gly Ala Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC GCC GAC GGC TCC GCC CTG CCC GGC CAG ATC CCC GGT TAC CGA GCT C	192
Ala Ala Asp Gly Ser Ala Leu Pro Gly Gln Ile Pro Gly Tyr Arg Ala	
50 55 60	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 474 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 1..474
 - (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SnbD"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CTG CAG GTC GAG GGC CGG CCC GCG CAC CTG GAA CTG CCC TGC GAC CAC	48
Leu Gln Val Glu Gly Arg Pro Ala His Leu Glu Leu Pro Cys Asp His	

121

1	5	10	15	
CCC CGG CCC GCC GTC GCC ACC CAC CGC GGC GCC ACC GTG CCC TTC CAC				96
Pro Arg Pro Ala Val Ala Thr His Arg Gly Ala Thr Val Pro Phe His	20	25	30	
ATC GAC GCC GGC CTC CAC GAG AAG CTG ACC GCG CTC TCC AAG GCE TGC				144
Ile Asp Ala Gly Leu His Glu Lys Leu Thr Ala Leu Ser Lys Ala Cys	35	40	45	
GAC AGC AGC CTG TTC ATG GTG CTC CAG GCC GCG GTC GCC GCC CTG CTC				192
Asp Ser Ser Leu Phe Met Val Leu Gln Ala Ala Val Ala Ala Leu Leu	50	55	60	
ACC CGG CAC GGC GCC GGC ACC GAC ATC CCC GTC GGC AGC CCC GTC GCC				240
Thr Arg His Gly Ala Gly Thr Asp Ile Pro Val Gly Ser Pro Val Ala	65	70	75	80
GGC CGC ACC GAC GAC GCC CTC GAC GAC CTG GTG GGC TTC TTC GTC AAC				288
Gly Arg Thr Asp Asp Ala Leu Asp Asp Leu Val Gly Phe Phe Val Asn	85	90	95	
ACC CTC GTC CTG CGC ACC GAC ACC TCC GGC GAC CCC ACC TTC CGC GAA				336
Thr Leu Val Leu Arg Thr Asp Thr Ser Gly Asp Pro Thr Phe Arg Glu	100	105	110	
CTC GTC GCA CGC GTG CGG CAG TTC GAC CTC GCC GCC TAC ACG CAC CAG				384
Leu Val Ala Arg Val Arg Gln Phe Asp Leu Ala Ala Tyr Thr His Gln	115	120	125	
GAC ATG CCG TTC GAA AAG CTC GTC GAA GAG GTC AAC CCC GAG CGC TCC				432
Asp Met Pro Phe Glu Lys Leu Val Glu Glu Val Asn Pro Glu Arg Ser	130	135	140	
CTG GCC CGC AAC CCG CTC TTC CAG GTC GTC CTG GCG CTG CAG				474
Leu Ala Arg Asn Pro Leu Phe Gln Val Val Leu Ala Leu Gln	145	150	155	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 485 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 3..485
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SnbE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

122

GC ATG CCG CGC TCC CTC GAC CTG TAC GTC GCA CTG CTC GCC GTC CTC	47
Met Pro Arg Ser Leu Asp Leu Tyr Val Ala Leu Leu Ala Val Leu	
1 5 10 15	
AAG ACC GGC GCC GCC TAC CTG CCC GTC GAC ATC TCC TAC CCG GCC GAA	95
Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Leu Pro Val Asp Ile Ser Tyr Pro Ala Glu	
20 25 30	
CGC ATC GCG TTC ATG ATC GAG GAC GCC CGC CCG GTG ACC GTC CTC GAC	143
Arg Ile Ala Phe Met Ile Glu Asp Ala Arg Pro Val Thr Val Leu Asp	
35 40 45	
CGC CTG CCC GAC GAC CTG GGC GCC TAC CGG GAC ACC GAC CTC ACC GAC	191
Arg Leu Pro Asp Asp Leu Gly Ala Tyr Arg Asp Thr Asp Leu Thr Asp	
50 55 60	
GCC GAC CGC ACG GCG CCG CTA CGG CCC GAA CAC CCG GCG TAC GTC ATC	239
Ala Asp Arg Thr Ala Pro Leu Arg Pro Glu His Pro Ala Tyr Val Ile	
65 70 75	
CAC ACC TCC GGC TCC ACC GGC ACC CCC AAG GCC GTC GTC ATG CCC CAC	287
His Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Ala Val Val Met Pro His	
80 85 90 95	
GCC GGC CTG GTC AAC CTG CTG ACC TGG CAC GCC CGC CGC TTC CCC GGC	335
Ala Gly Leu Val Asn Leu Leu Thr Trp His Ala Arg Arg Phe Pro Gly	
100 105 110	
GGC ACC GGG GTG CGC ACC GCC CAG TTC ACC GCC ATC GGC TTC GAC TTC	383
Gly Thr Gly Val Arg Thr Ala Gln Phe Thr Ala Ile Gly Phe Asp Phe	
115 120 125	
TCG GTG CAG GAG ATC CTC TCC CCG CTC GTC ATG GGC AAG ACC CTC GCC	431
Ser Val Gln Glu Ile Leu Ser Pro Leu Val Met Gly Lys Thr Leu Ala	
130 135 140	
GTG CCC TCG GAA GAG GTC CGC CAC AGC GCC GAA CTG CTG GCC GGC TGG	479
Val Pro Ser Glu Glu Val Arg His Ser Ala Glu Leu Leu Ala Gly Trp	
145 150 155	
CTC GAG	485
Leu Glu	
160	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 291 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *S.pristinaespiralis*

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..291

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Partie du gene SnbE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

[illegible]

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

(a) tout ou partie des gènes snaA (SEQ ID n° 2), snaB (SEQ ID n° 3), snaC (SEQ ID n° 7), snaD (SEQ ID n° 8), papA (SEQ ID n° 9), papM (SEQ ID n° 10), samS (SEQ ID n° 4), snbA (SEQ ID n° 5), snbC (SEQ ID n° 11 et 12), snbD (SEQ ID n° 13 et 14), snbE (SEQ ID n° 15 et 16) et snbR (SEQ ID n° 6),

(b) les séquences adjacentes aux gènes (a) constituant les clusters de biosynthèse et codant pour les polypeptides impliqués dans la biosynthèse des Streptogramines,

(c) les séquences hybridant avec tout ou partie des gènes (a) ou (b) et codant pour un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, et,

(d) les séquences dérivées des séquences (a), (b) et (c) en raison de la dégénérescence du code génétique.

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les gènes snaA, snaB, snaC, snaD, papA, papM, samS, snbA, snbC, snbD, snbE et snbR.

4. ADN recombinant comprenant un gène de biosynthèse des Streptogramines.

5. ADN recombinant selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie des cosmides pIBV1, pIBV2, pIBV3 ou pIBV4 tels que représentés sur les figures 4 à 7 ou tout ou partie de séquences hybridant avec les cosmides pIBV1 à pIBV4 ou avec des fragments de ceux-ci.

6. Vecteur d'expression à réplication autonome et/ou intégratif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3 ou un ADN recombinant selon l'une des revendications 4 et 5.

7. Vecteur selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le cosmide pIBV1 (figure 4), le cosmide pIBV2 (figure 5), le cosmide pIBV3 (figure 6), le cosmide pIBV4 (figure 7), le plasmide pVRC402 (figure 15(A)), le

plasmide pVRC501 (figure 15(B)), le plasmide pXL2045 (figure 16), et les plasmides pVRC1105, pVRC1106, pVRC1104, pVRC900, pVRC1000, pVRC509, pVRC903, pVRC409, pVRC505, pVRC701, pVRC702, pVRC508, pVRC404, pVRC507, et pVRC706 représentés respectivement sur les figures 17 à 31.

5 8. Cellule recombinante contenant une séquence nucléotidique et/ou un ADN recombinant et/ou un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de production d'un polypeptide impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante
10 selon la revendication 8 et on récupère le polypeptide produit.

10. Utilisation d'une cellule recombinante selon la revendication 8 exprimant un polypeptide au moins impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines, dans une réaction de bioconversion.

11. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications
15 1 à 5 pour amplifier la production de Streptogramines.

12. Procédé de production de Streptogramines caractérisé en ce que :

- on introduit et/ou on amplifie dans une cellule productrice de Streptogramines ou potentiellement productrice de Streptogramines une ou plusieurs séquences et/ou vecteurs selon l'une des revendications 1 à 7,
- 20 - on cultive ladite cellule dans des conditions de production des Streptogramines, et,
- on récupère les Streptogramines produites.

13. Procédé selon la revendication 12 pour la production de Pristinamycines, Mikamycines ou Virginiamycines.

25 14. Procédé de préparation de cellules bloquées dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que l'on effectue, sur une cellule productrice de Streptogramine, une mutagénèse sur au moins un gène de la voie de biosynthèse.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la mutagenèse est effectuée in vitro ou in situ, par suppression, substitution, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases dans le gène considéré, ou par disruption génique.

5 16. Mutant d'un microorganisme producteur de Streptogramines caractérisé en ce qu'il possède une modification génétique au moins dans un gène impliqué dans la biosynthèse des Streptogramines.

17. Procédé de préparation d'un intermédiaire de biosynthèse des Streptogramines caractérisé en ce que :

- 10 - on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et
- on récupère l'intermédiaire accumulé.

18. Procédé de préparation d'une molécule dérivée des Streptogramines caractérisé en ce que :

- 15 - on prépare une cellule bloquée dans une étape de la voie de biosynthèse des Streptogramines selon la revendication 14,
- on cultive ladite cellule, et
- on modifie l'intermédiaire accumulé par cette cellule, éventuellement après séparation du milieu de culture.

20

19. Procédé de préparation de Streptogramines comprenant la culture d'une cellule selon la revendication 16 contenant en outre une séquence nucléotidique et/ou un ADN recombinant et/ou un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 7.

25

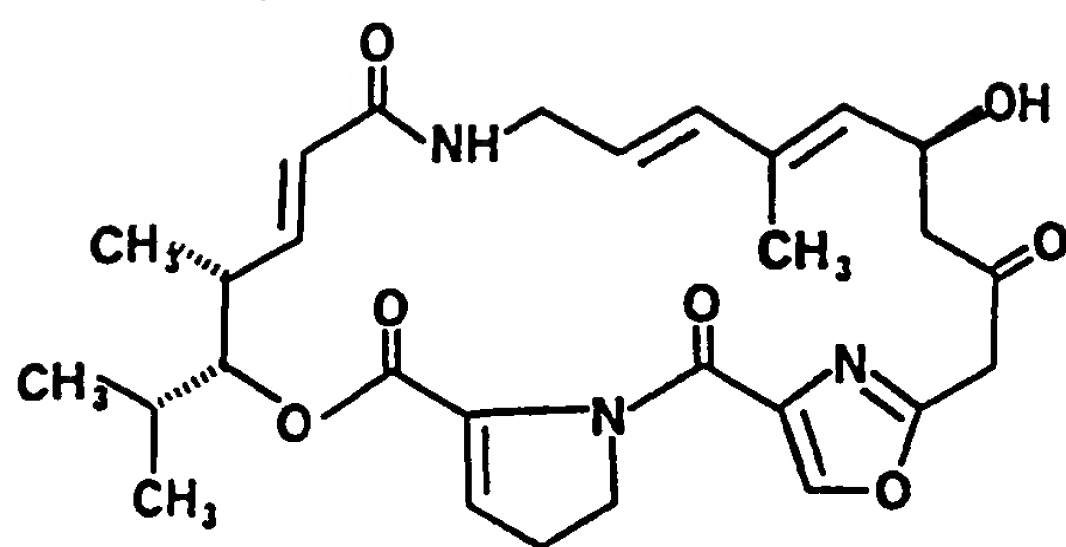
20. Utilisation d'une séquence et/ou d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 7 pour la préparation d'antibiotiques hybrides.

21. Polypeptide résultant de l'expression d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 5.

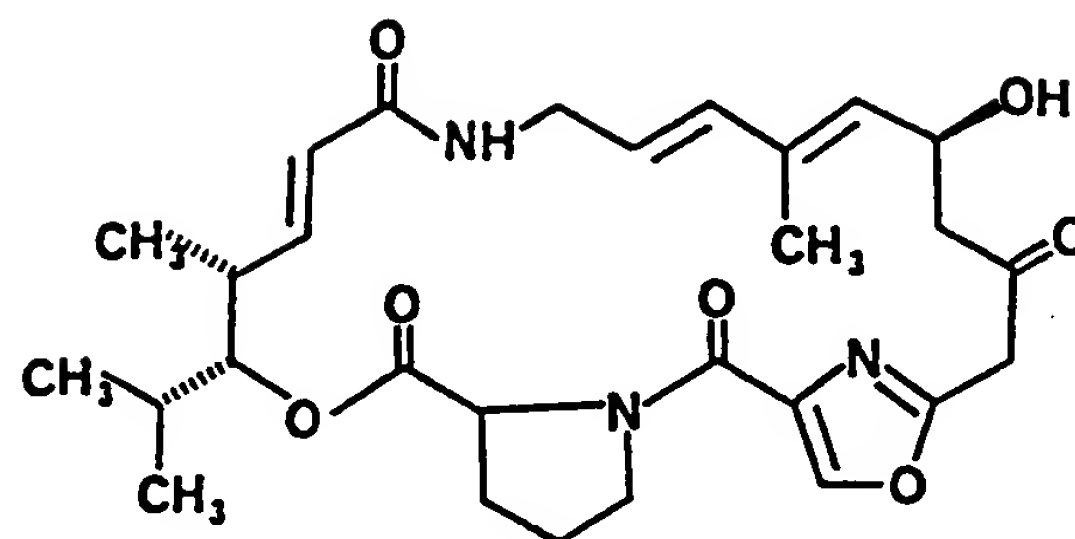
30

22. Polypeptide comprenant tout ou partie des polypeptides SnaA (SEQ ID n° 2), SnaB (SEQ ID n° 3), SnaC (SEQ ID n° 7), SnaD (SEQ ID n° 8), PapA (SEQ ID n° 9), PapM (SEQ ID n° 10), SamS (SEQ ID n° 4), SnbA (SEQ ID n° 5),

SnbC (SEQ ID n° 11 et 12), SnbD (SEQ ID n° 13 et 14), SnbE (SEQ ID n° 15 et 16) et SnbR (SEQ ID n° 6) ou de dérivés de ceux-ci.



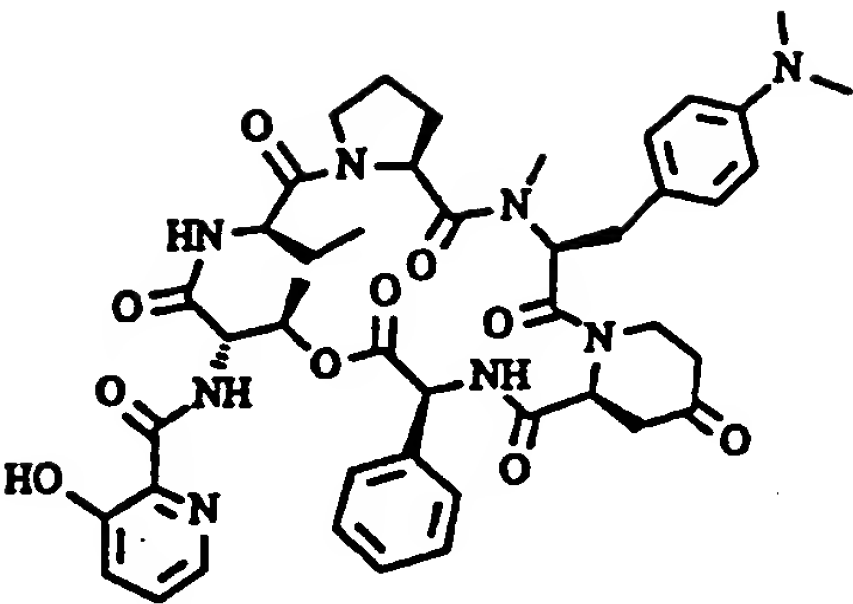
Formule 1



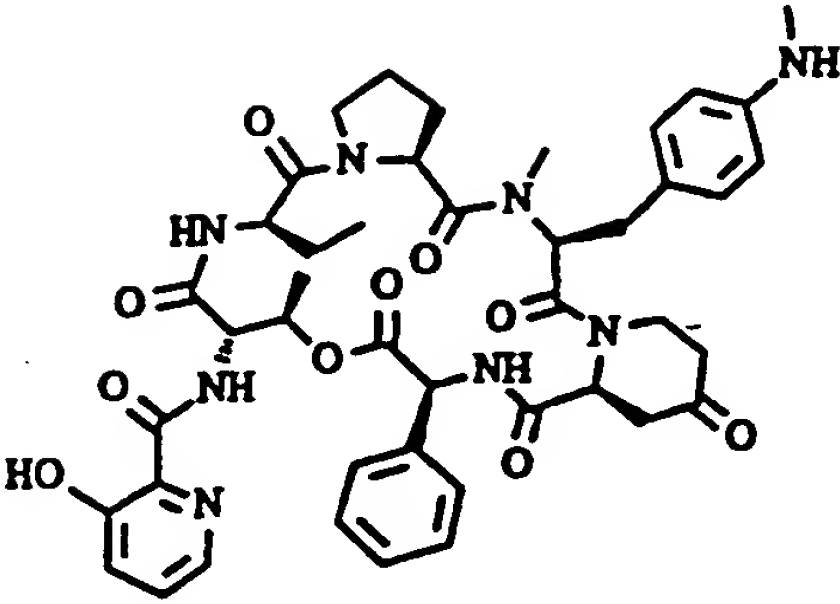
Formule 2

Formule 1	Formule 2
Pristinamycine IIA	Pristinamycine IIB
Mikamycine A	
Ostréogrycine A	Ostréogrycine G
Streptogramine A	
Synergistine A-I	
Vernamycine A	
Virginiamycine M1	Virginiamycine M2

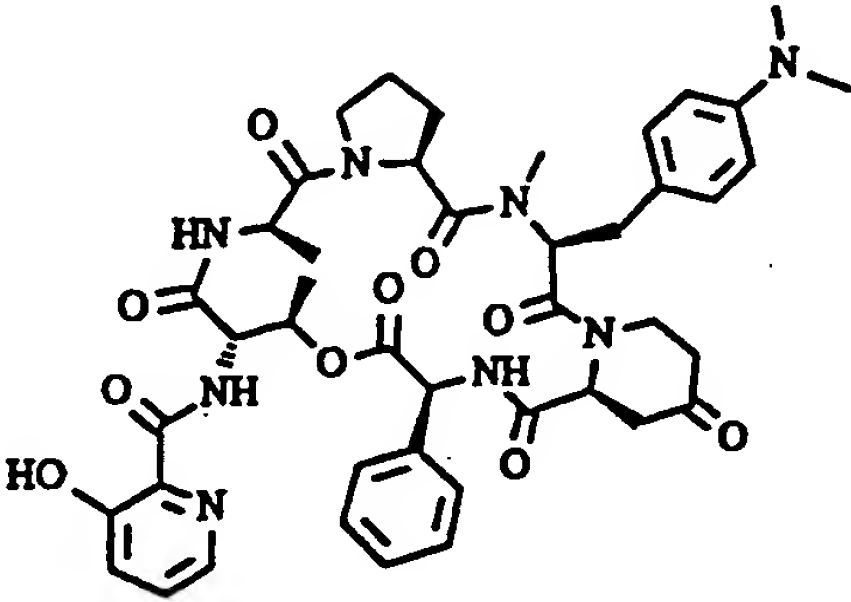
FIGURE 1



Formule 1



Formule 2



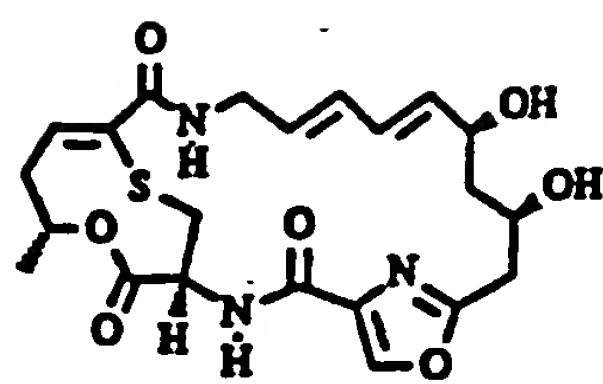
Formule 3

Formule 1	Formule 2	Formule 3
Pristinamycine IA Streptogramine B PA114B1 Vernamycine B α Ostréogrycine B Mikamycine IA	Pristinamycine IB Vernamycine B β Ostréogrycine B2	Pristinamycine IC Vernamycine B γ Ostréogrycine B1

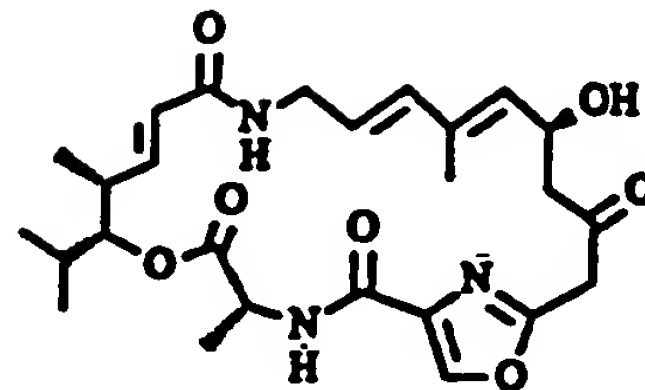
FIGURE 2

3/33

A

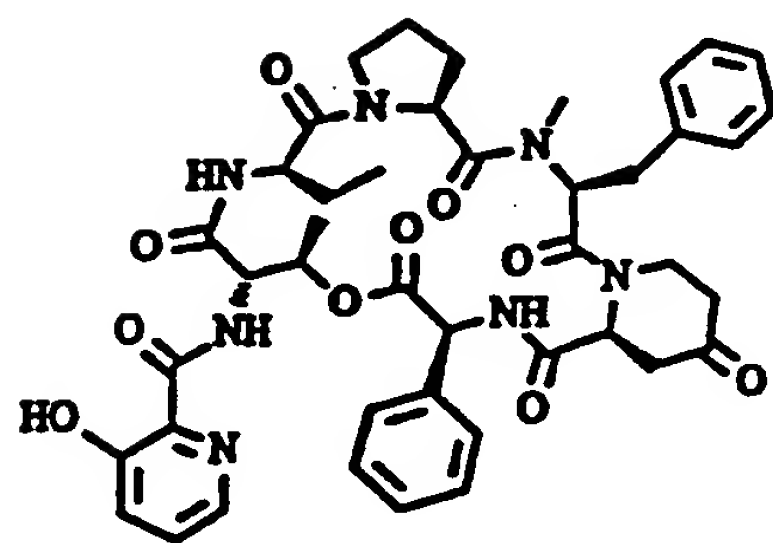


GRISEOVERIDIN

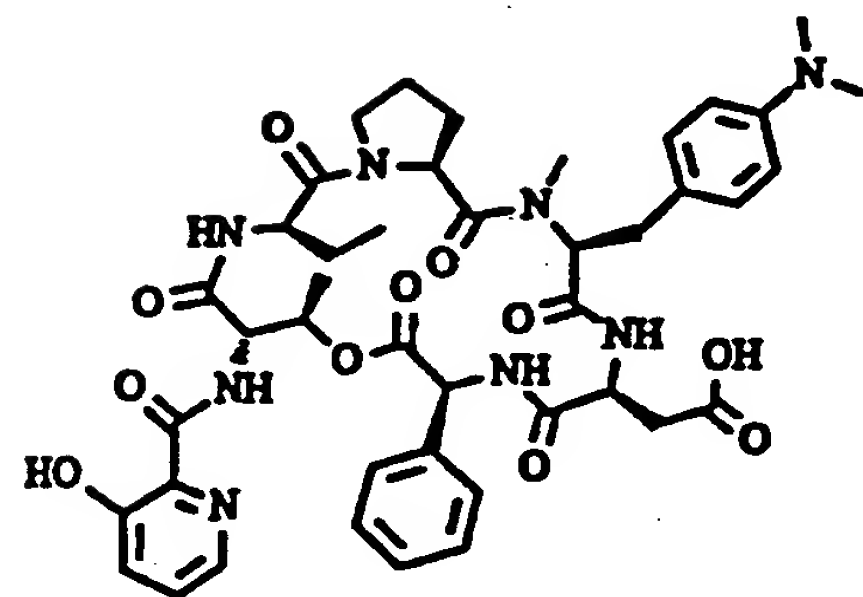


MADUMYCIN I

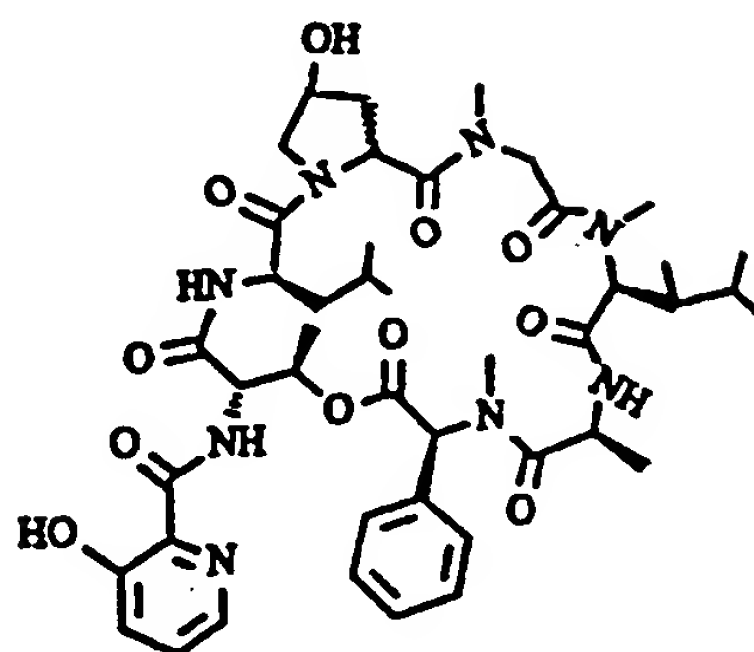
B



VIRGINIAMYCIN S₁



VERNAMYCIN C



ETAMYCIN

FIGURE 3

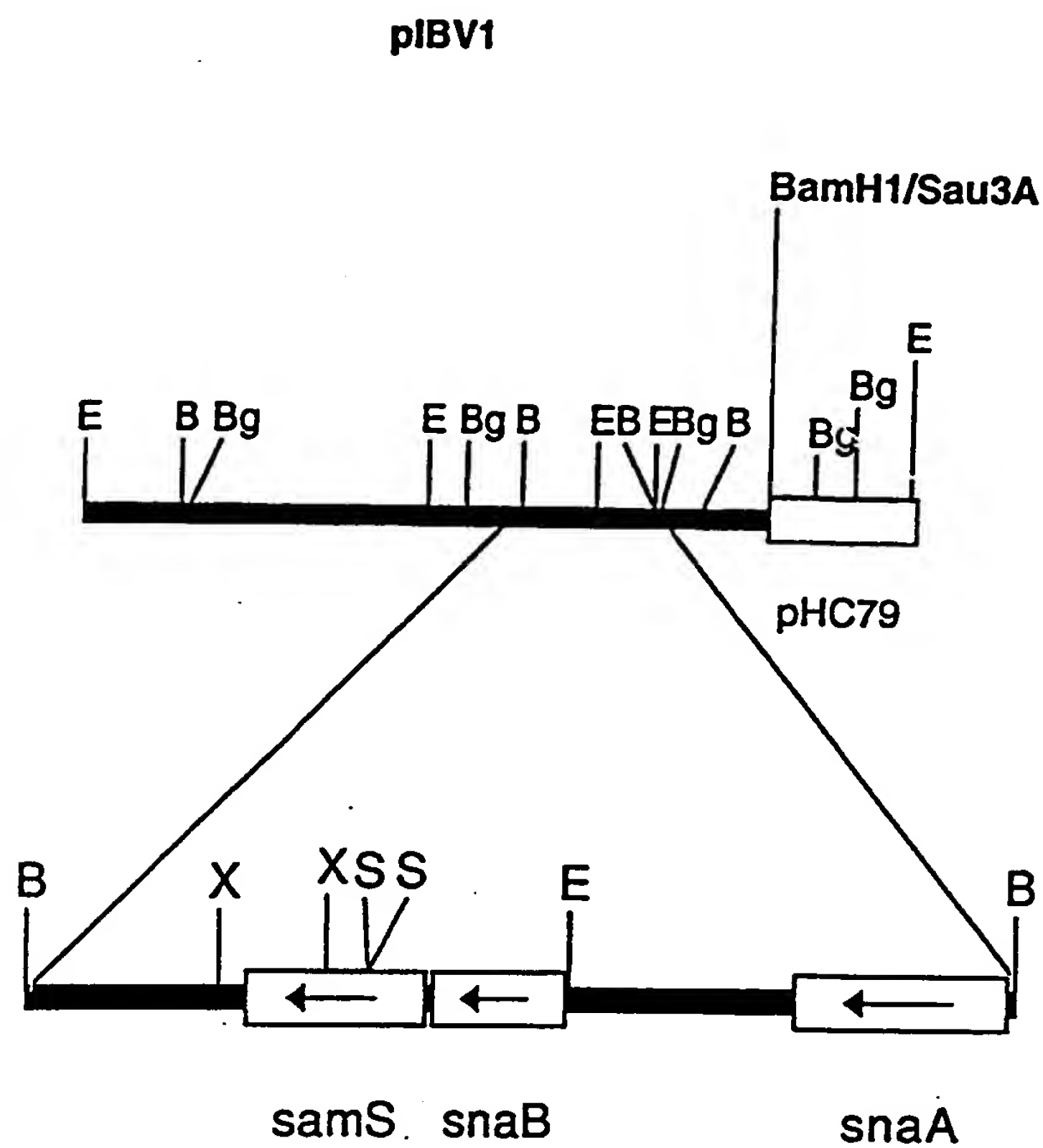


FIGURE 4

5/33

pIBV2

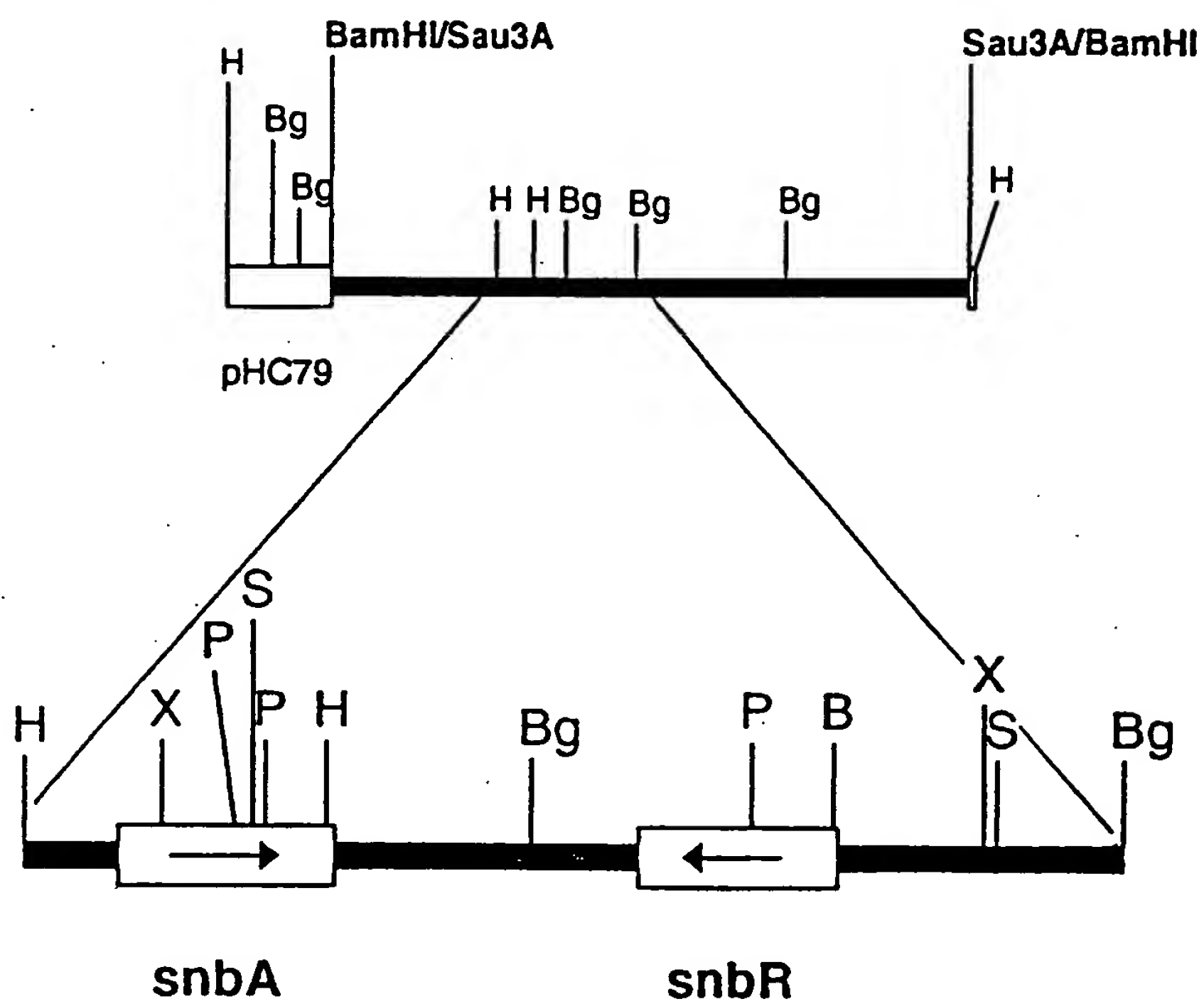
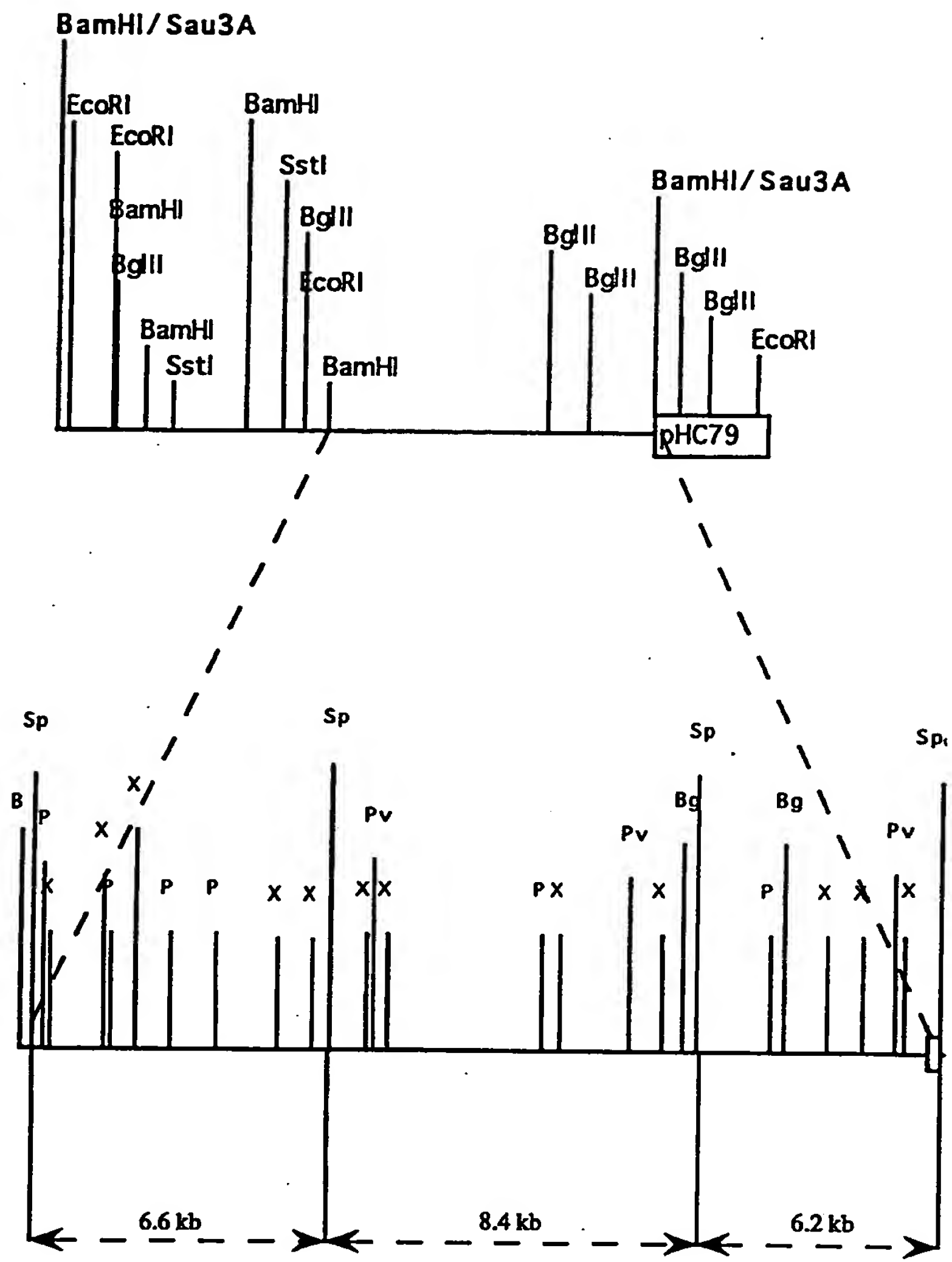


FIGURE 5

pIBV3



B: BamHI
Sp: SphI
P: PstI
X: XhoI
Pv: PvuII

FIGURE 6

pIBV4

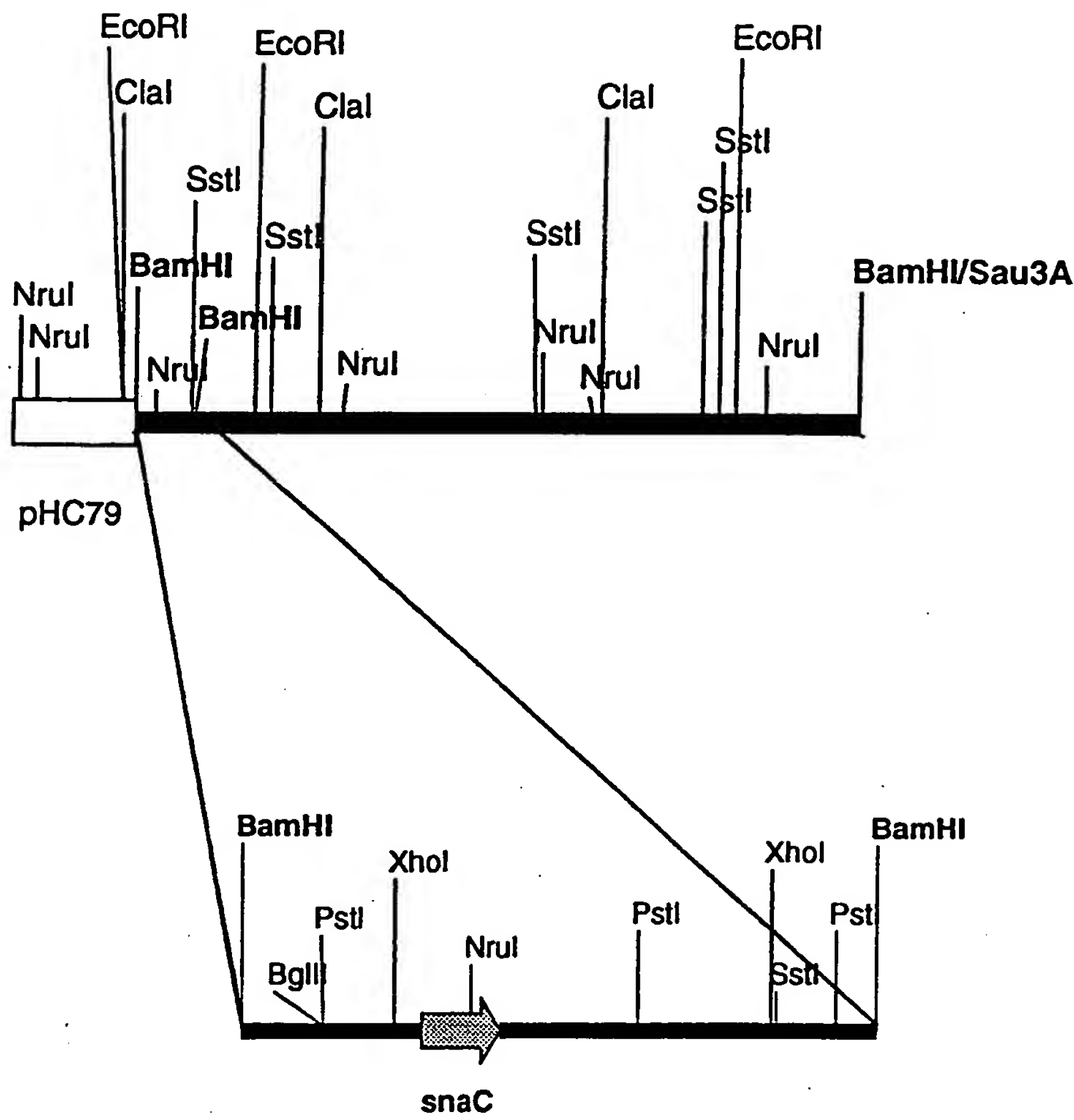


FIGURE 7

8/33

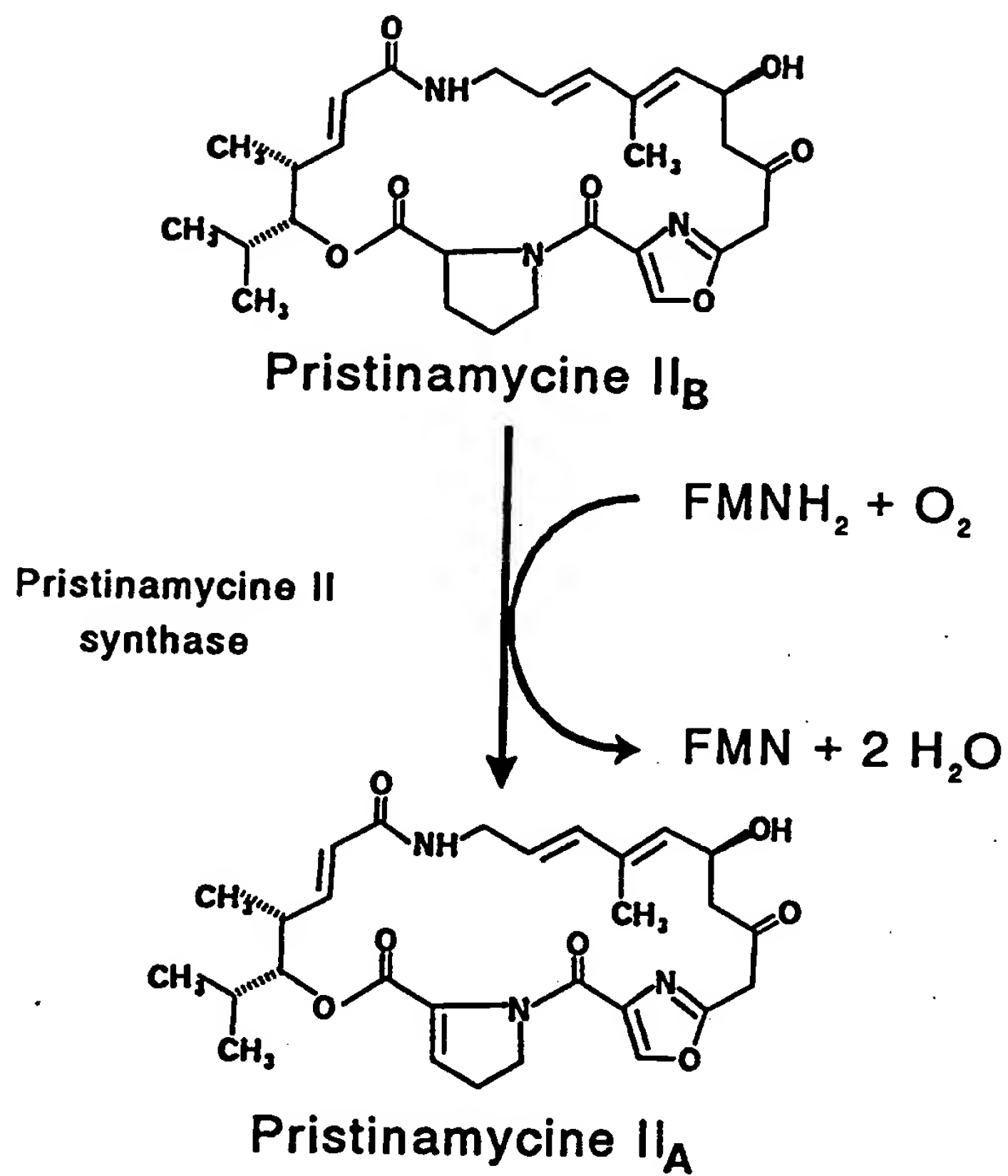


FIGURE 8

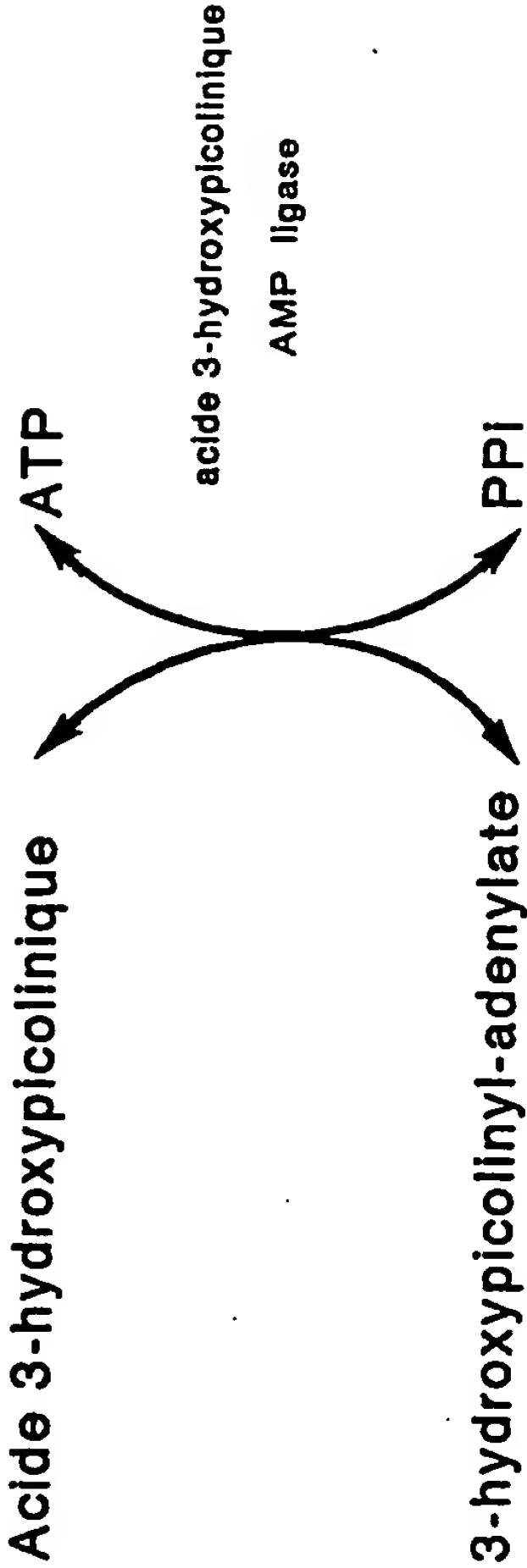


FIGURE 9

10/33

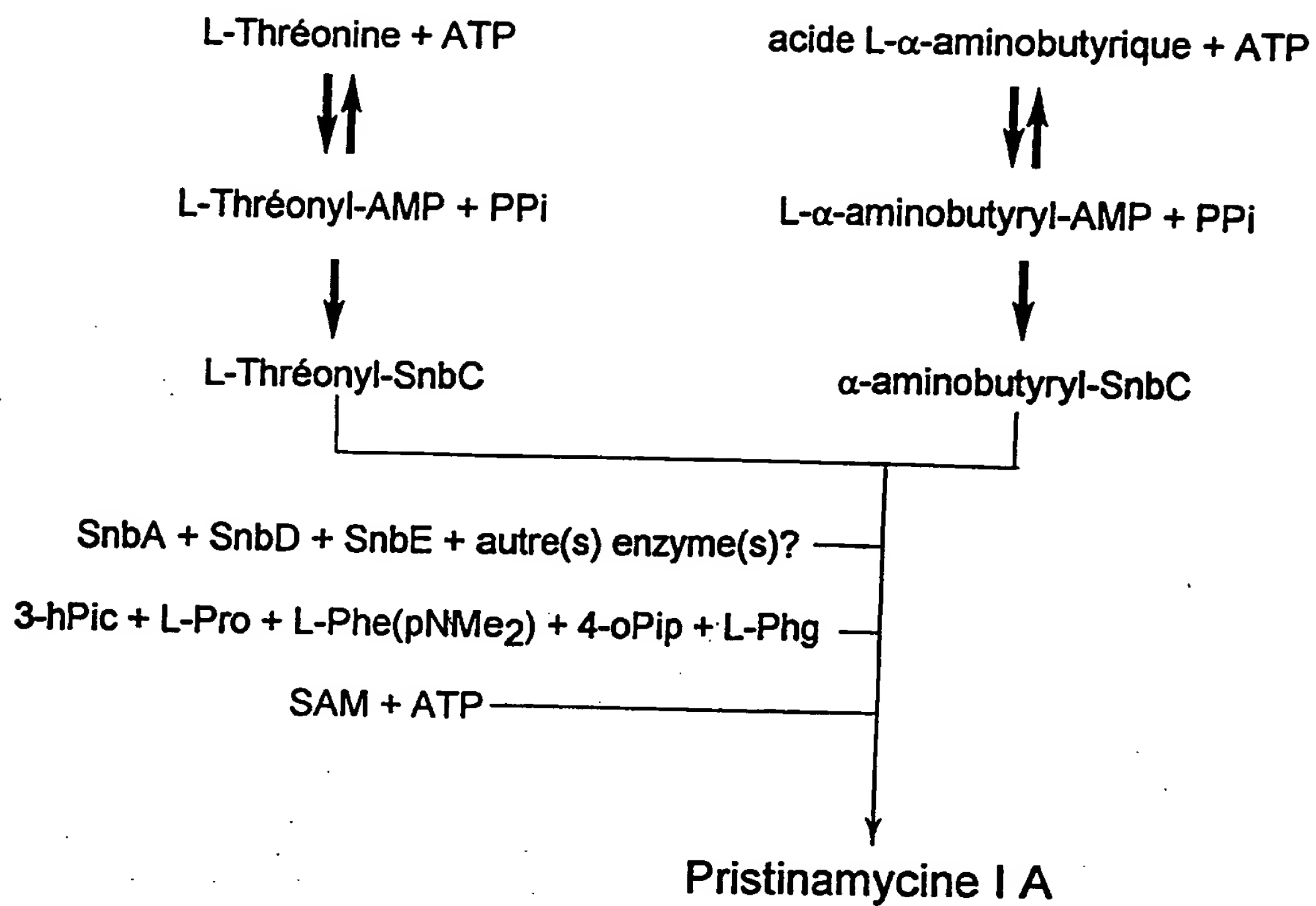


FIGURE 10

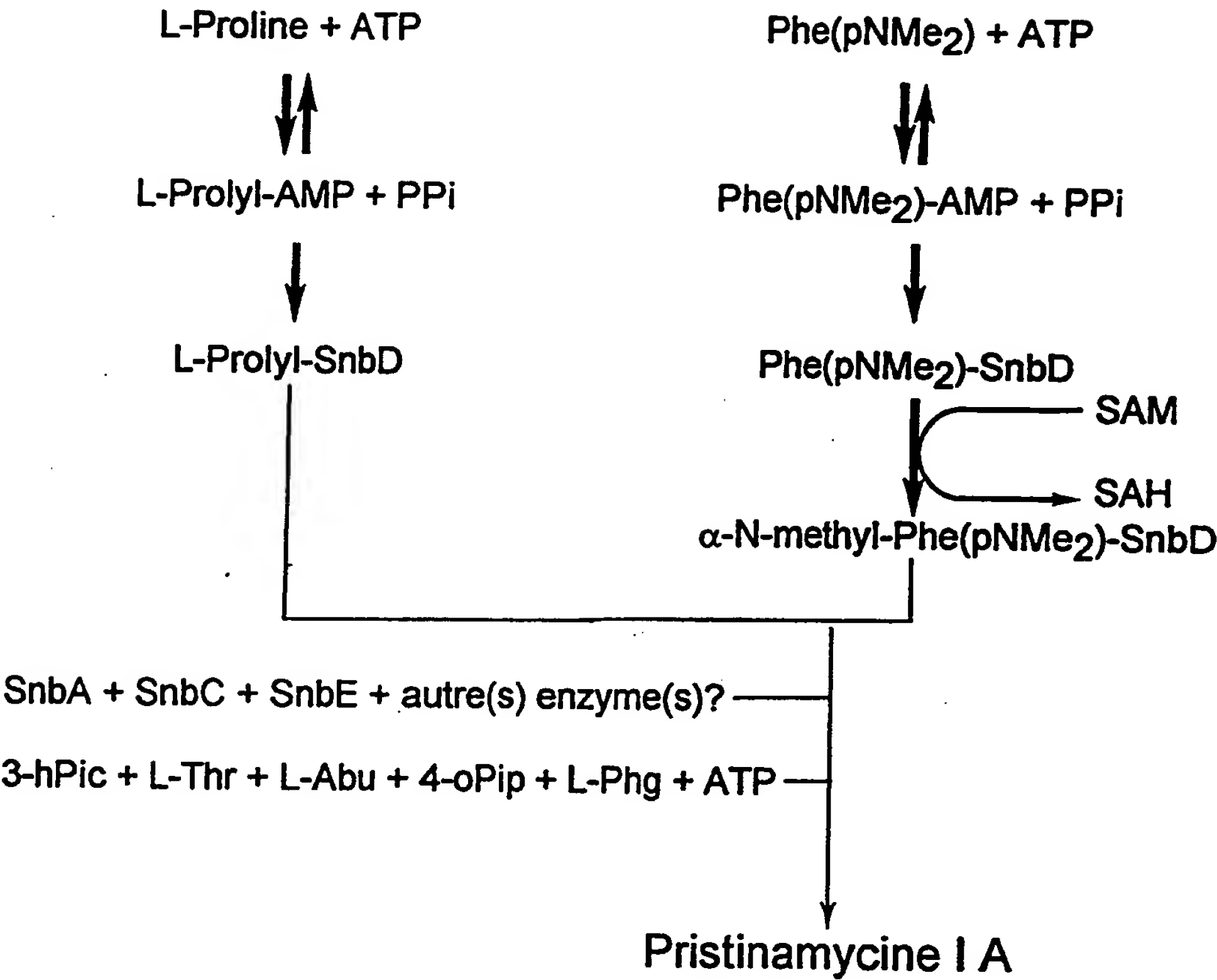


FIGURE 11

12/33

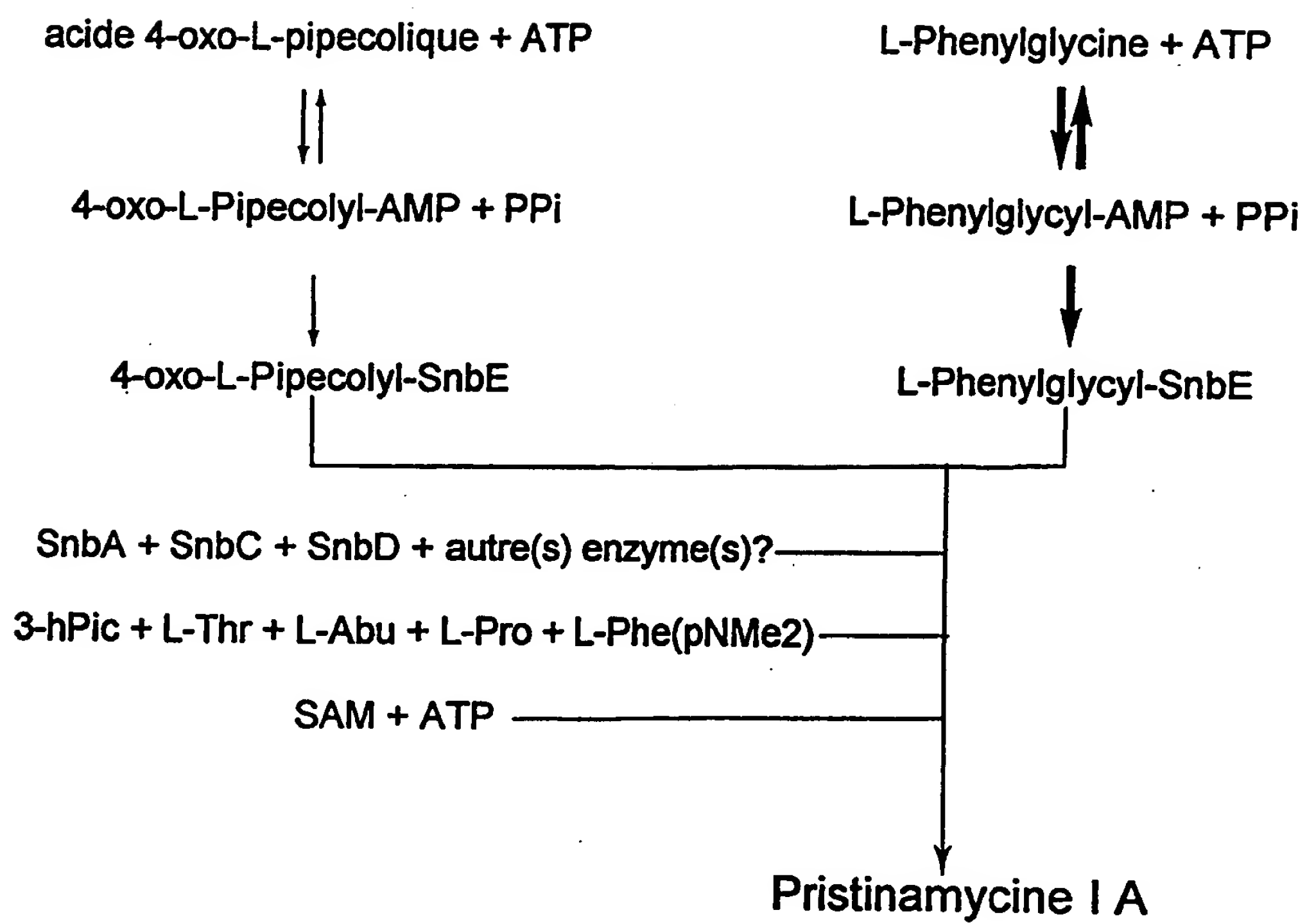


FIGURE 12

13/33

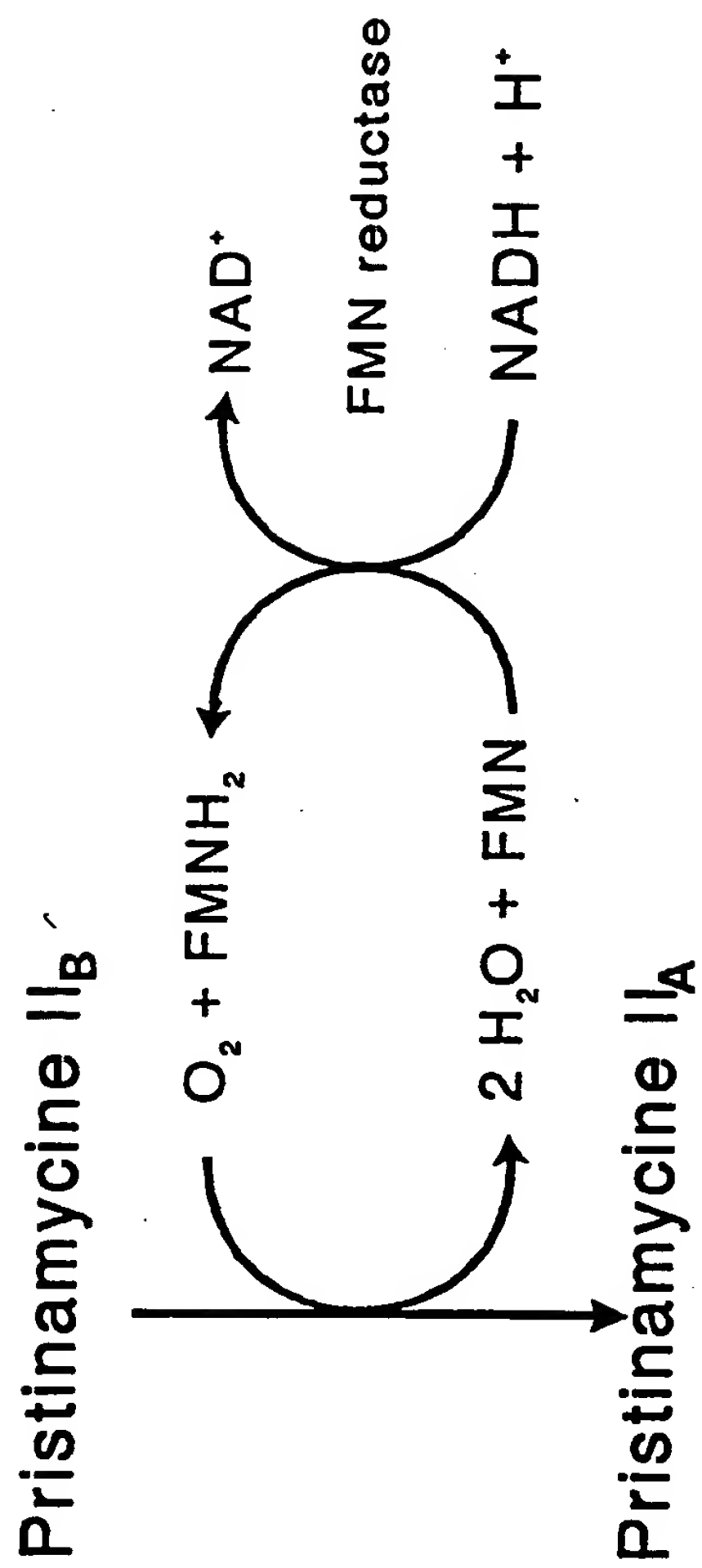
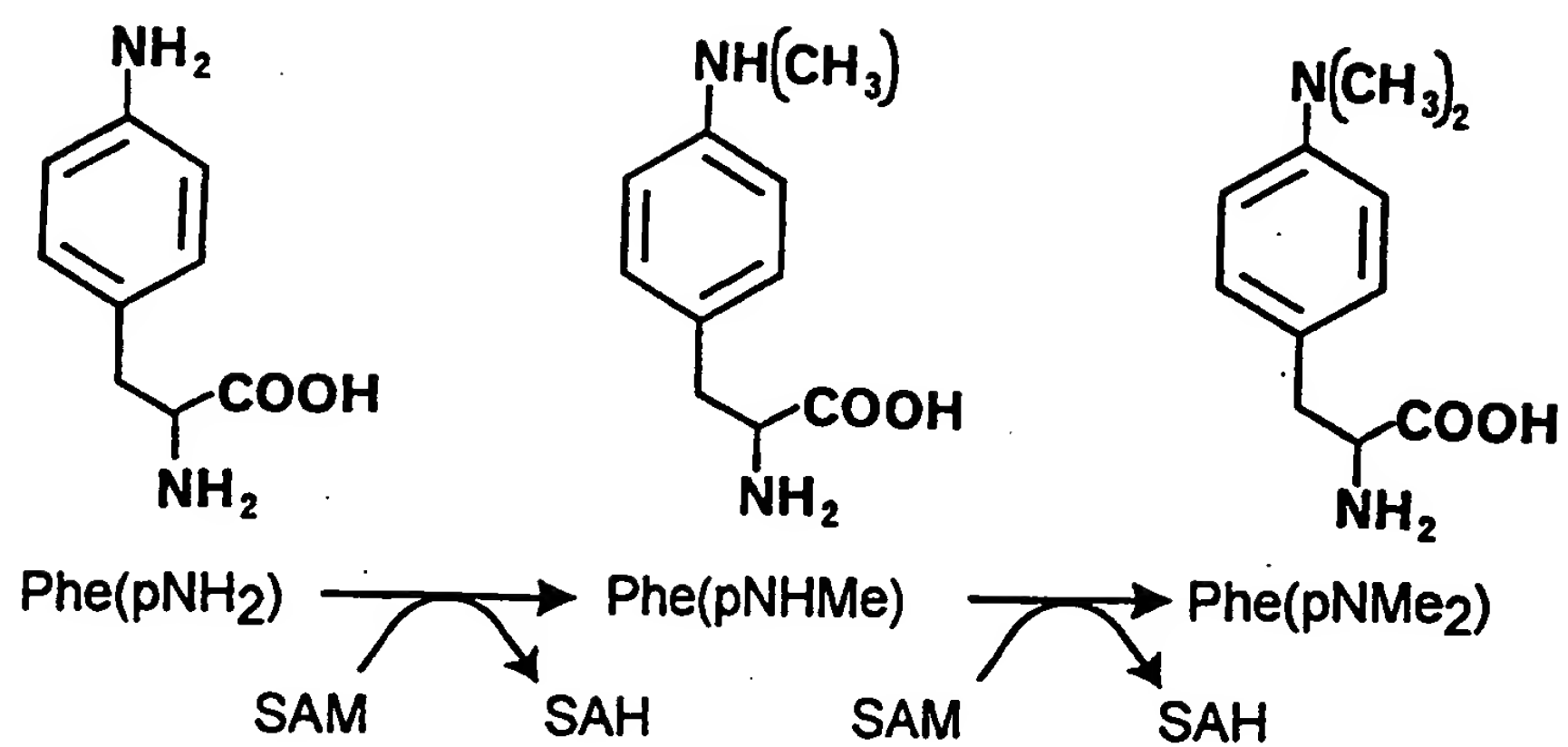


FIGURE 13

14/33



Phe(pNH₂) : paraaminophenylalanine
Phe(pNMe) : paramethylaminophenylalanine
Phe(pNMe₂) : paradimethylaminophenylalanine

FIGURE 14

15/33

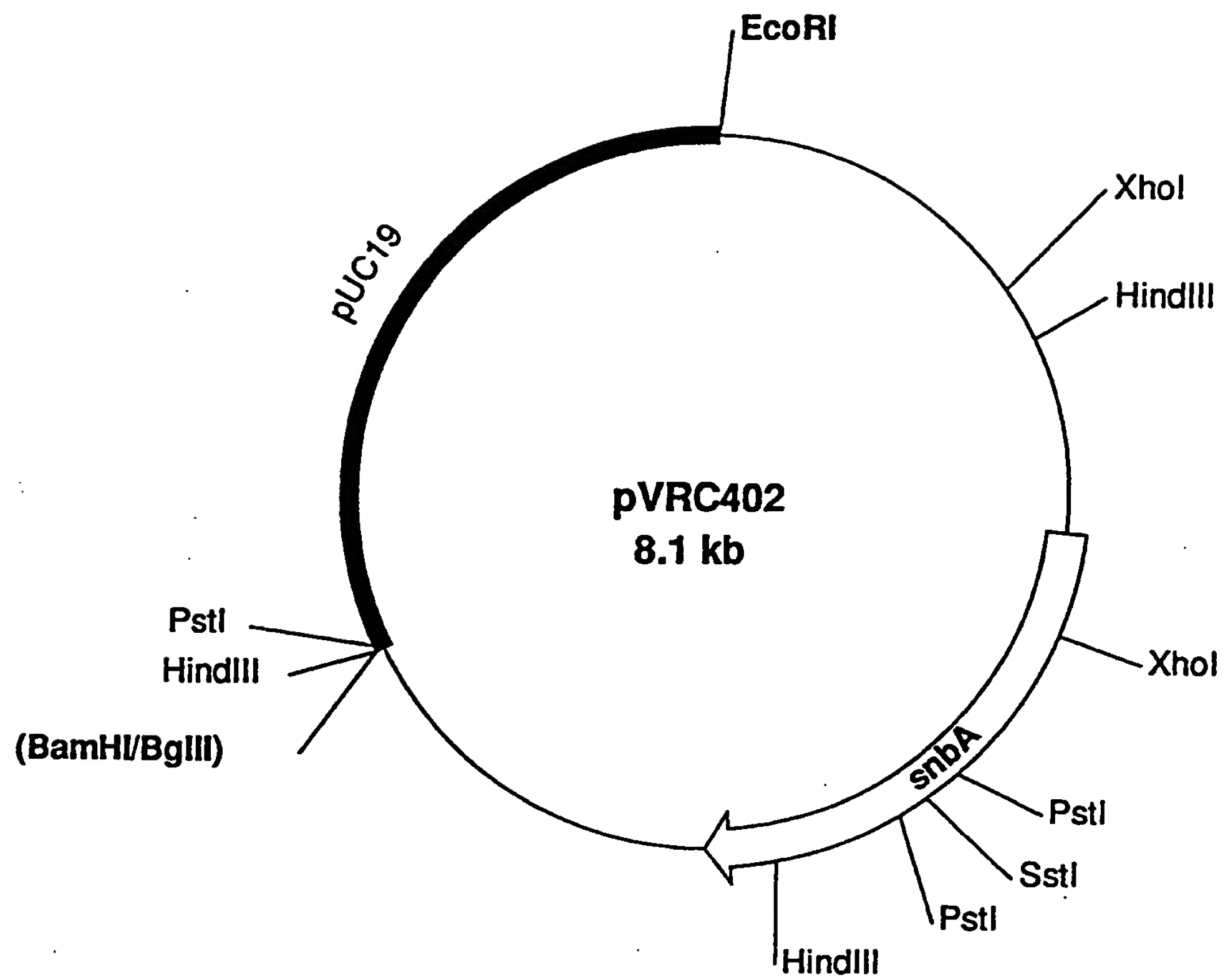


Figure 15 (A)

16/33

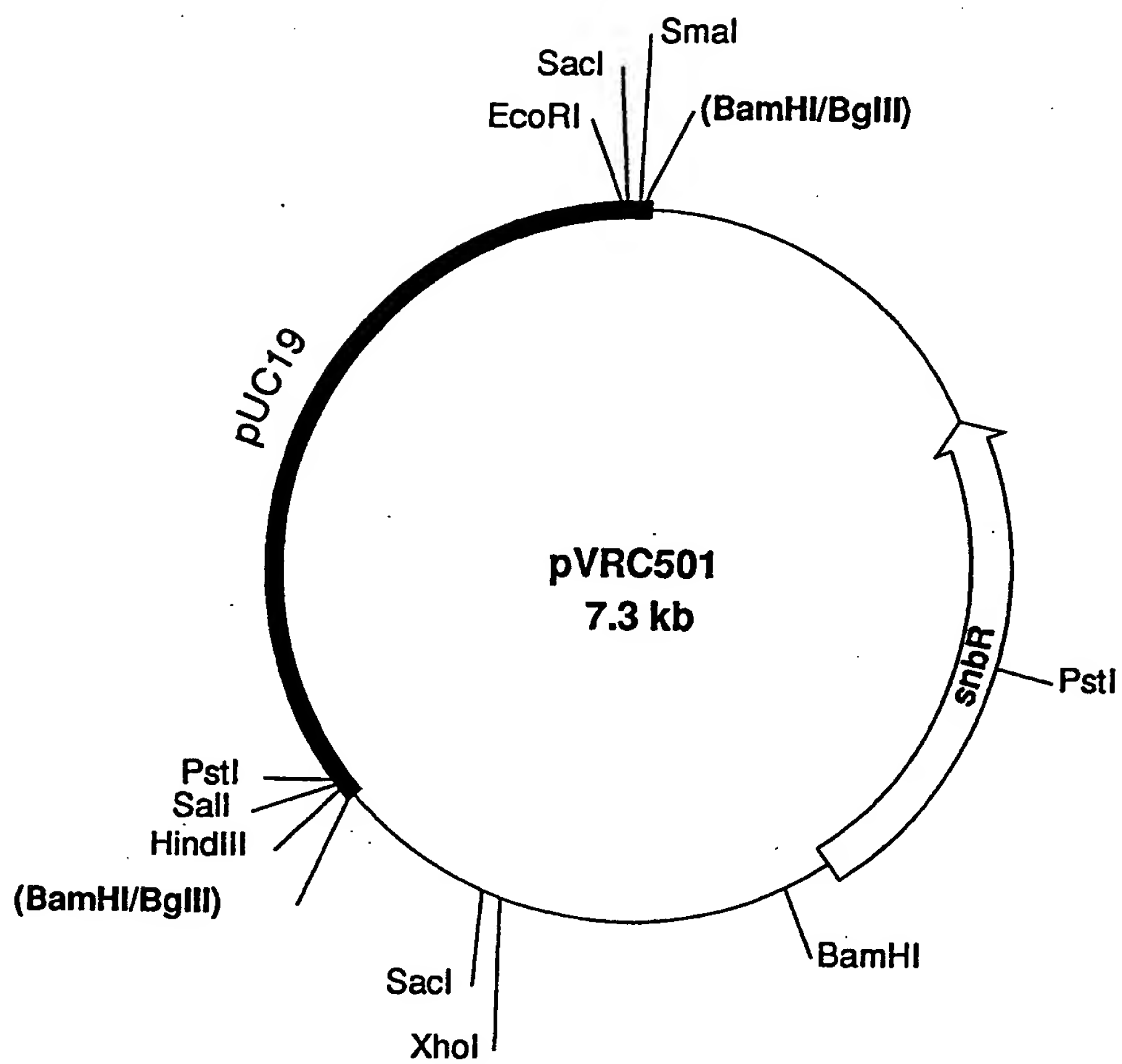


Figure 15 (B)

17/33

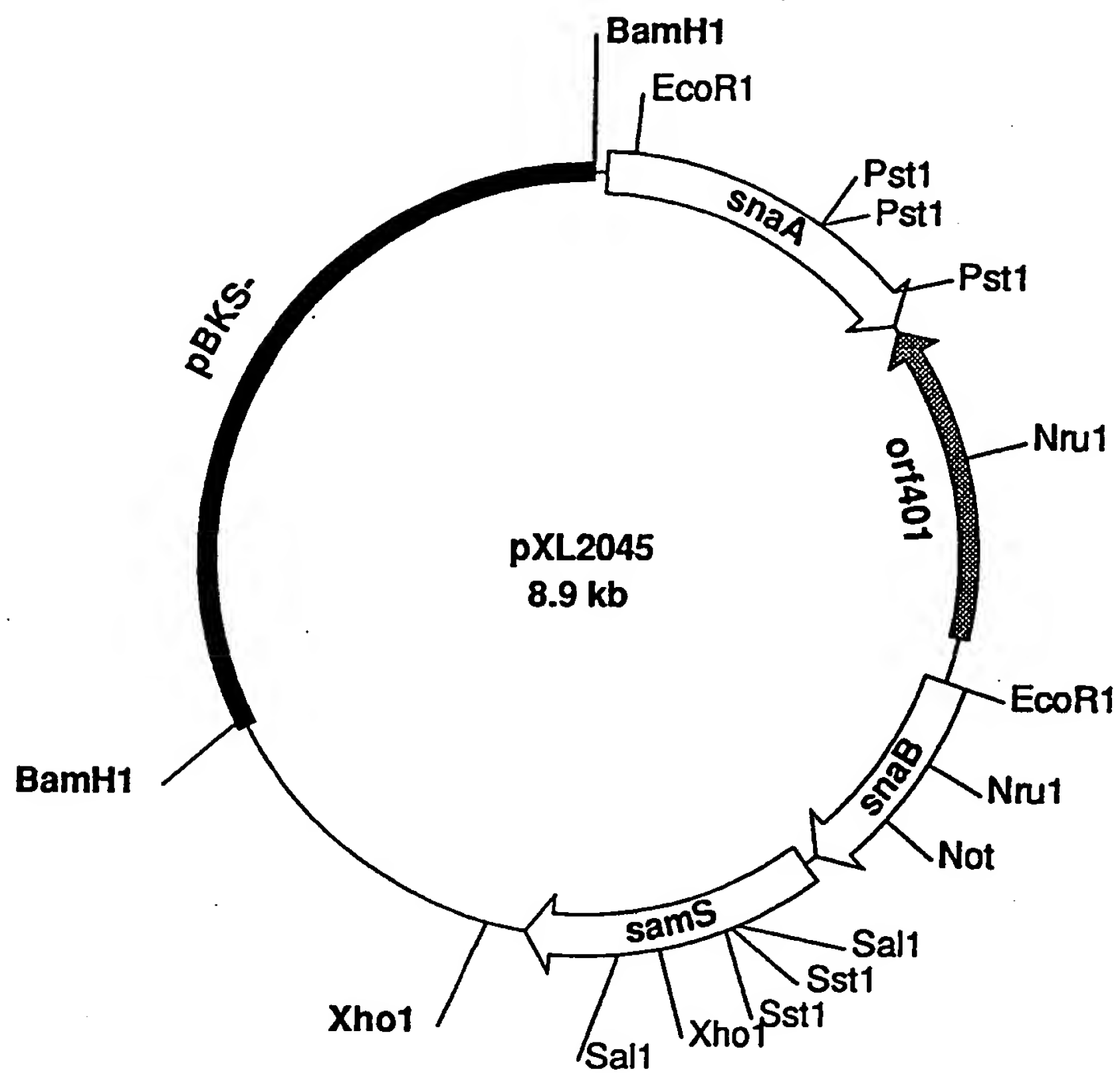


FIGURE 16

18/33

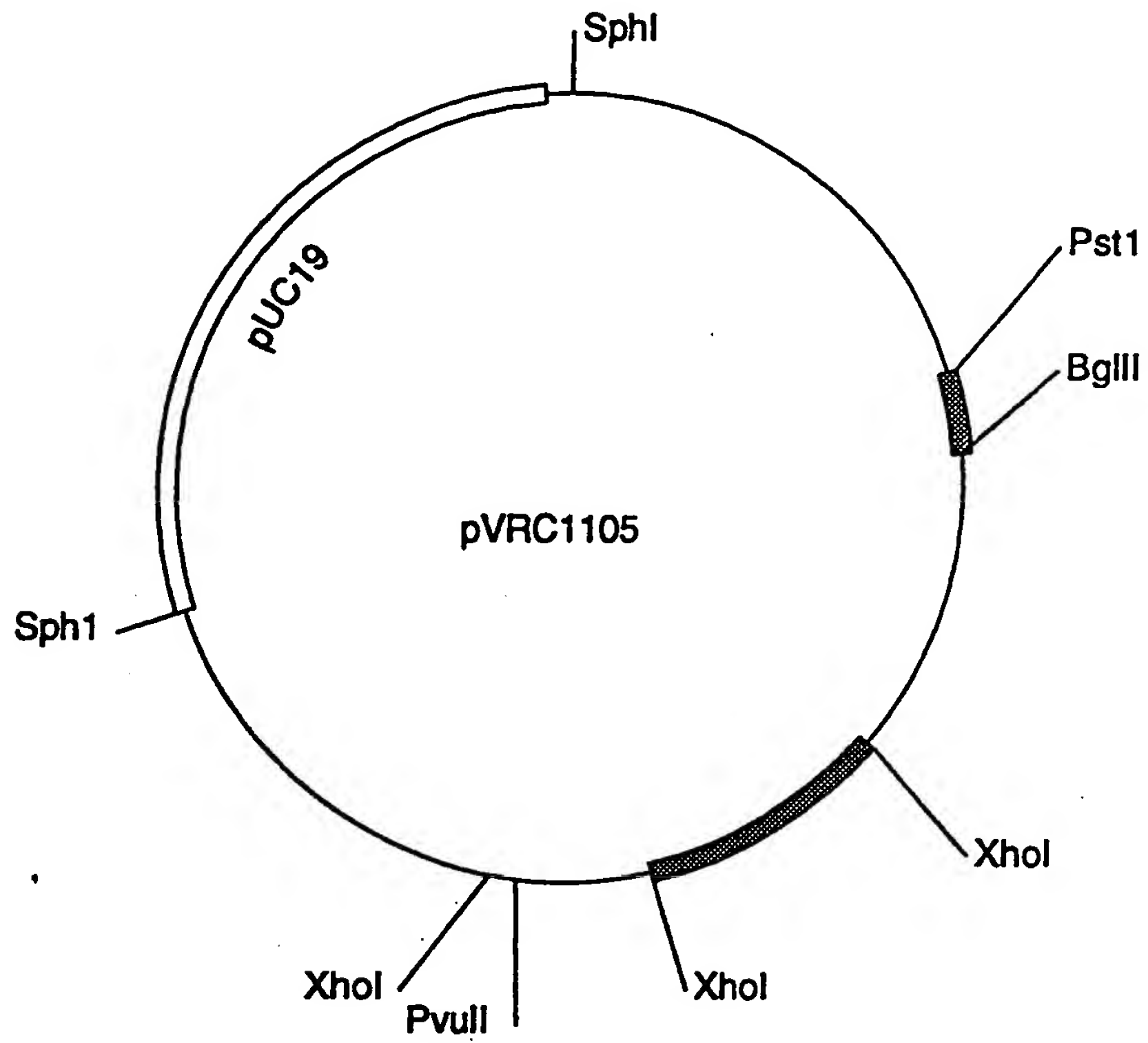


Figure 17.

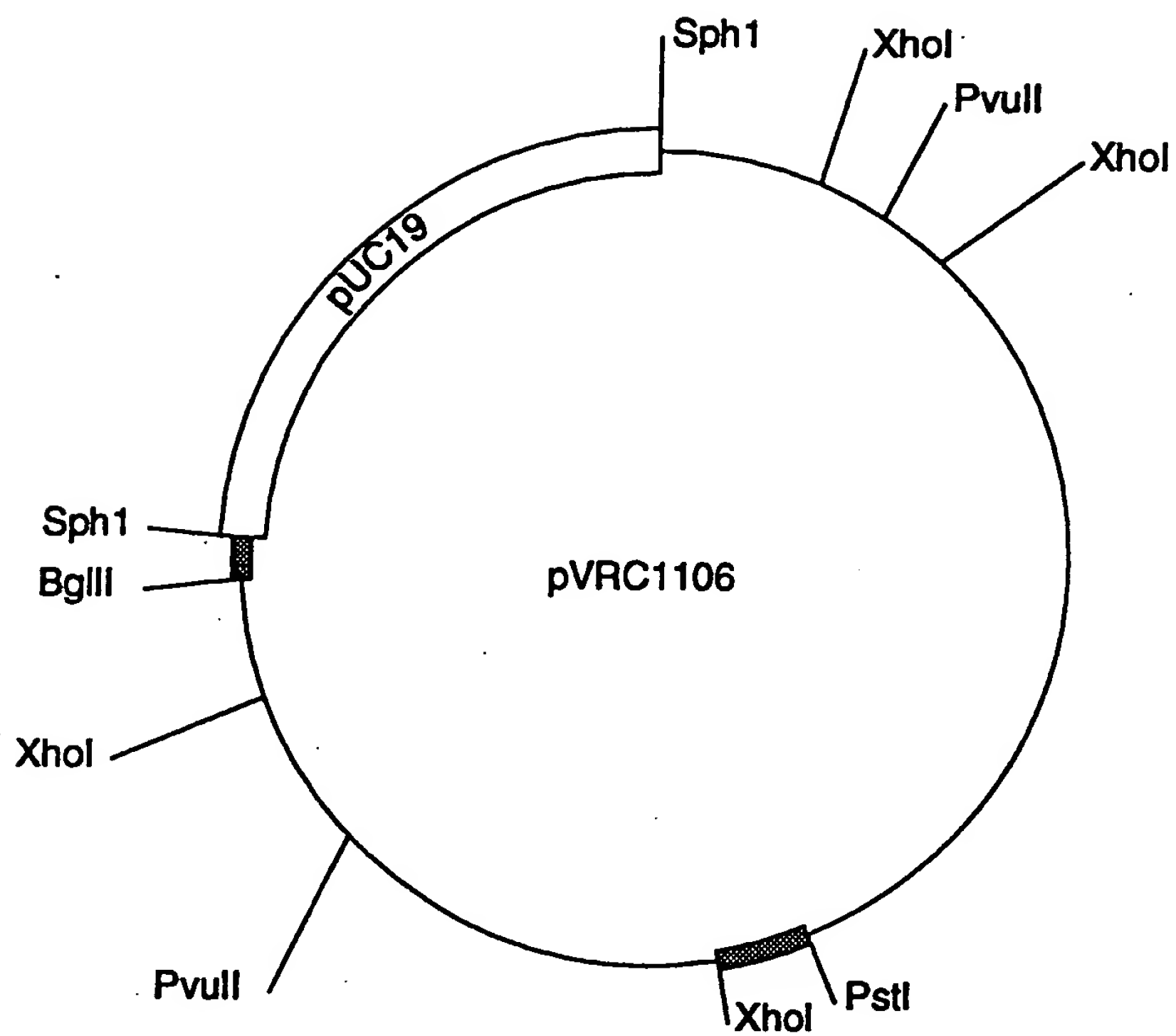


Figure 18.

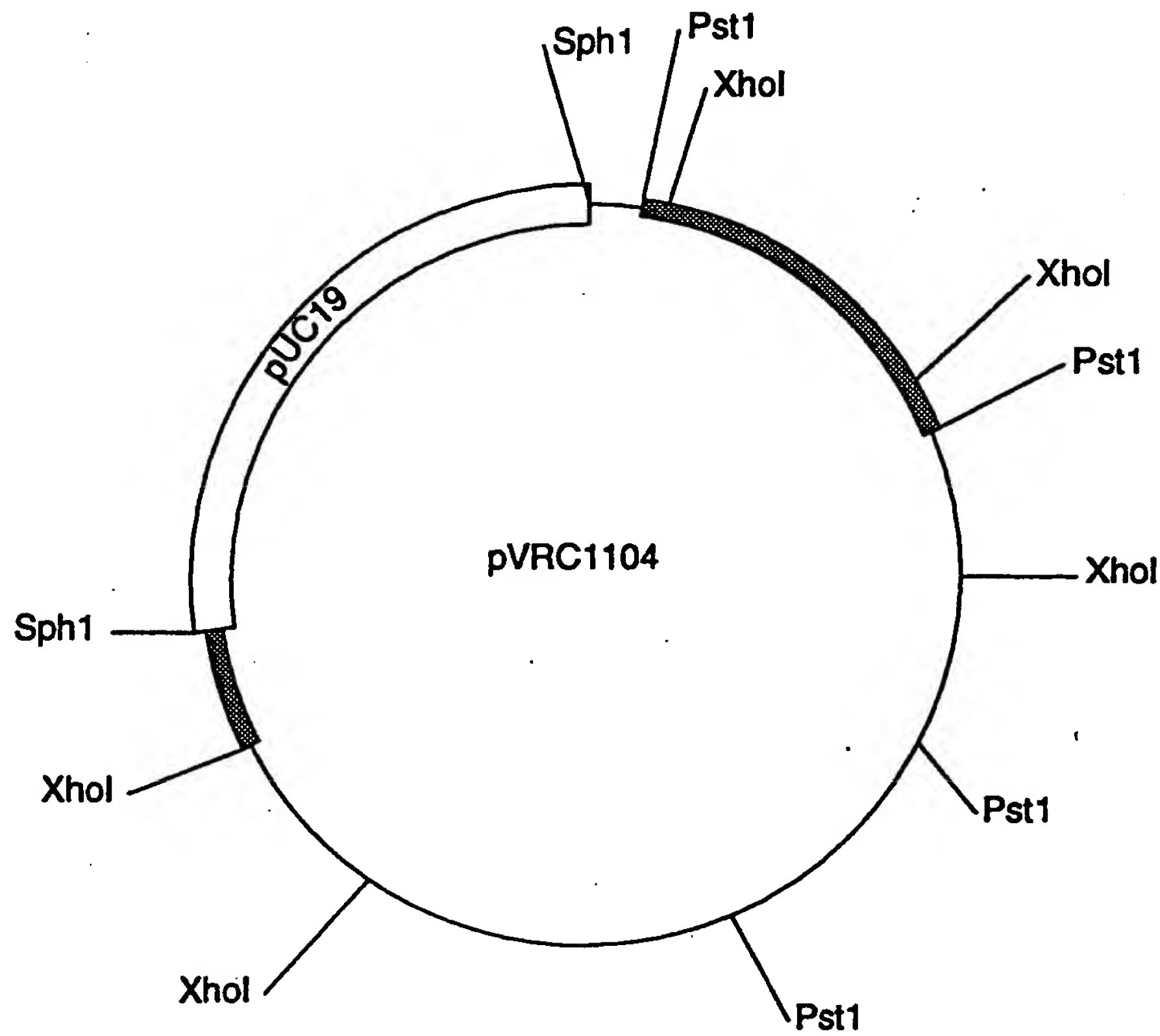


Figure 19.

21/33

pVRC900

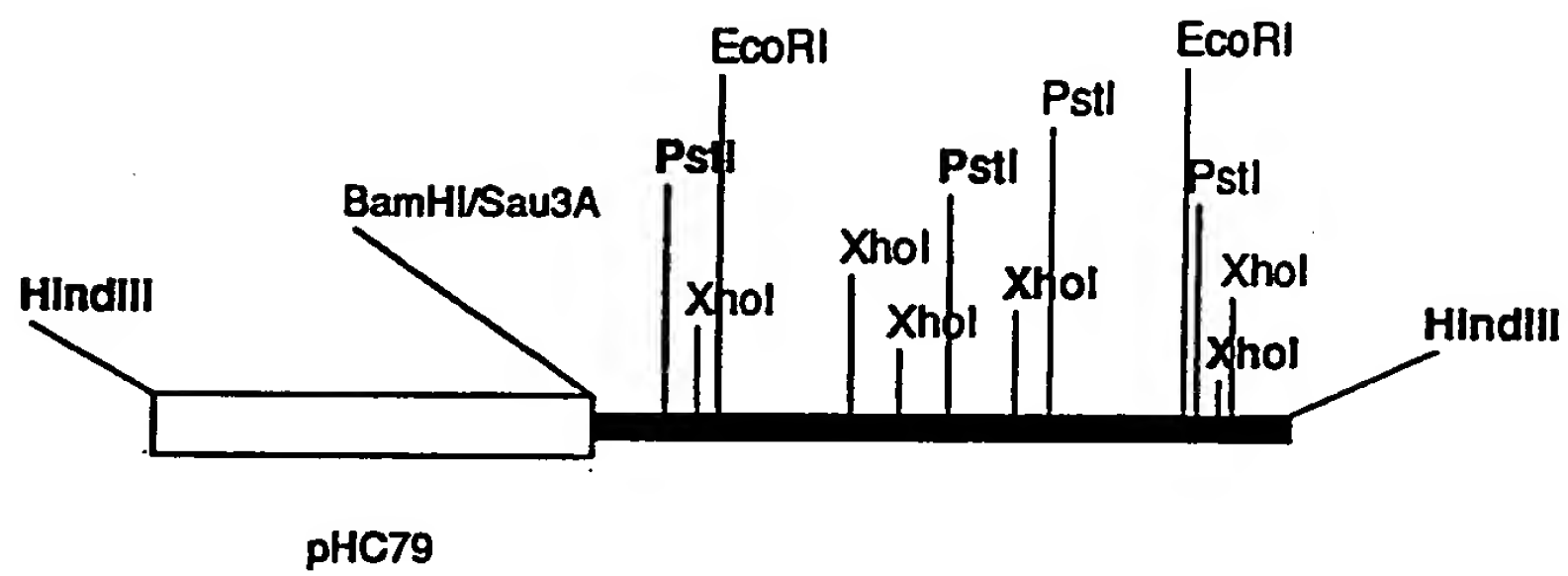


Figure 20

22/33

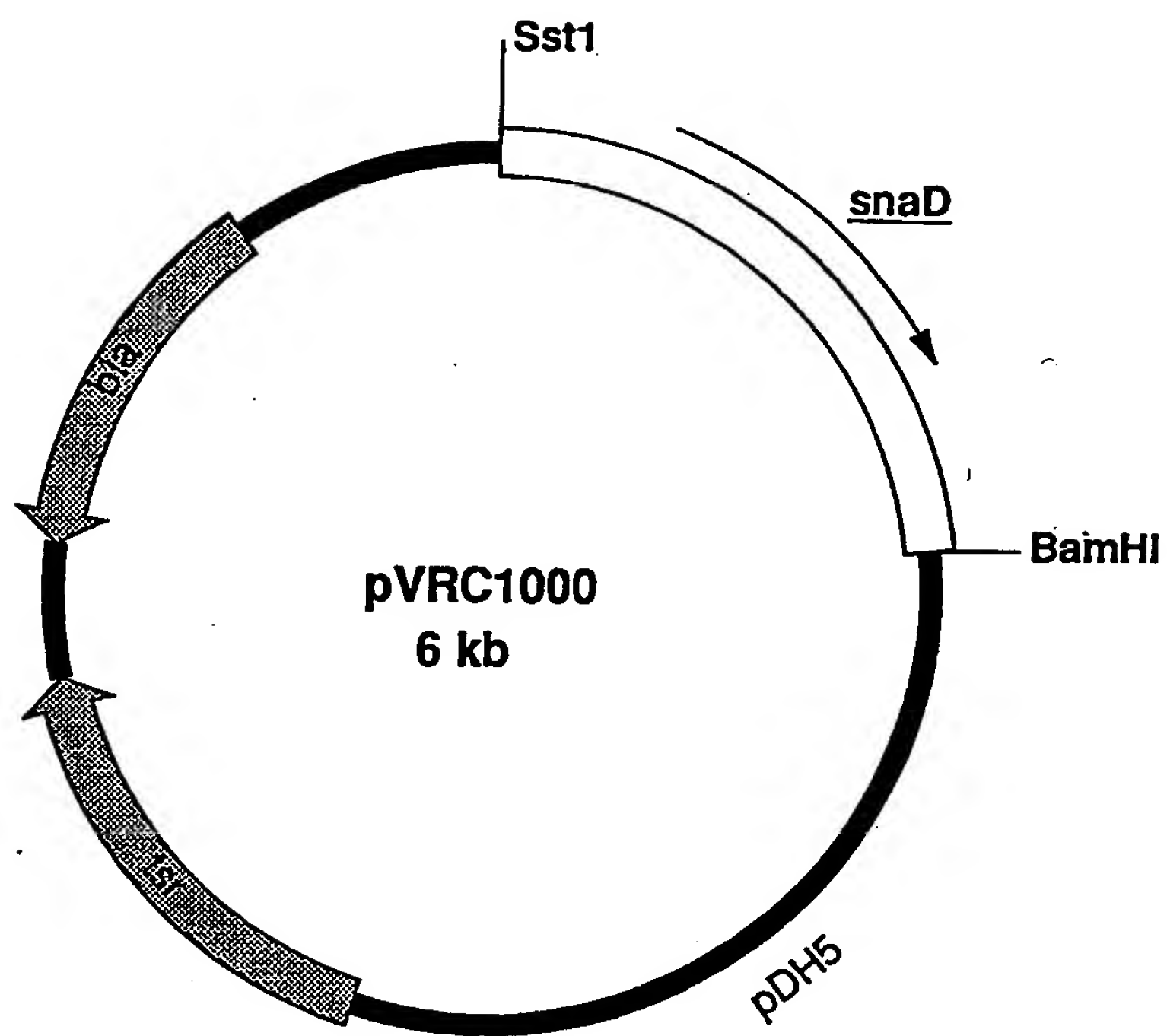
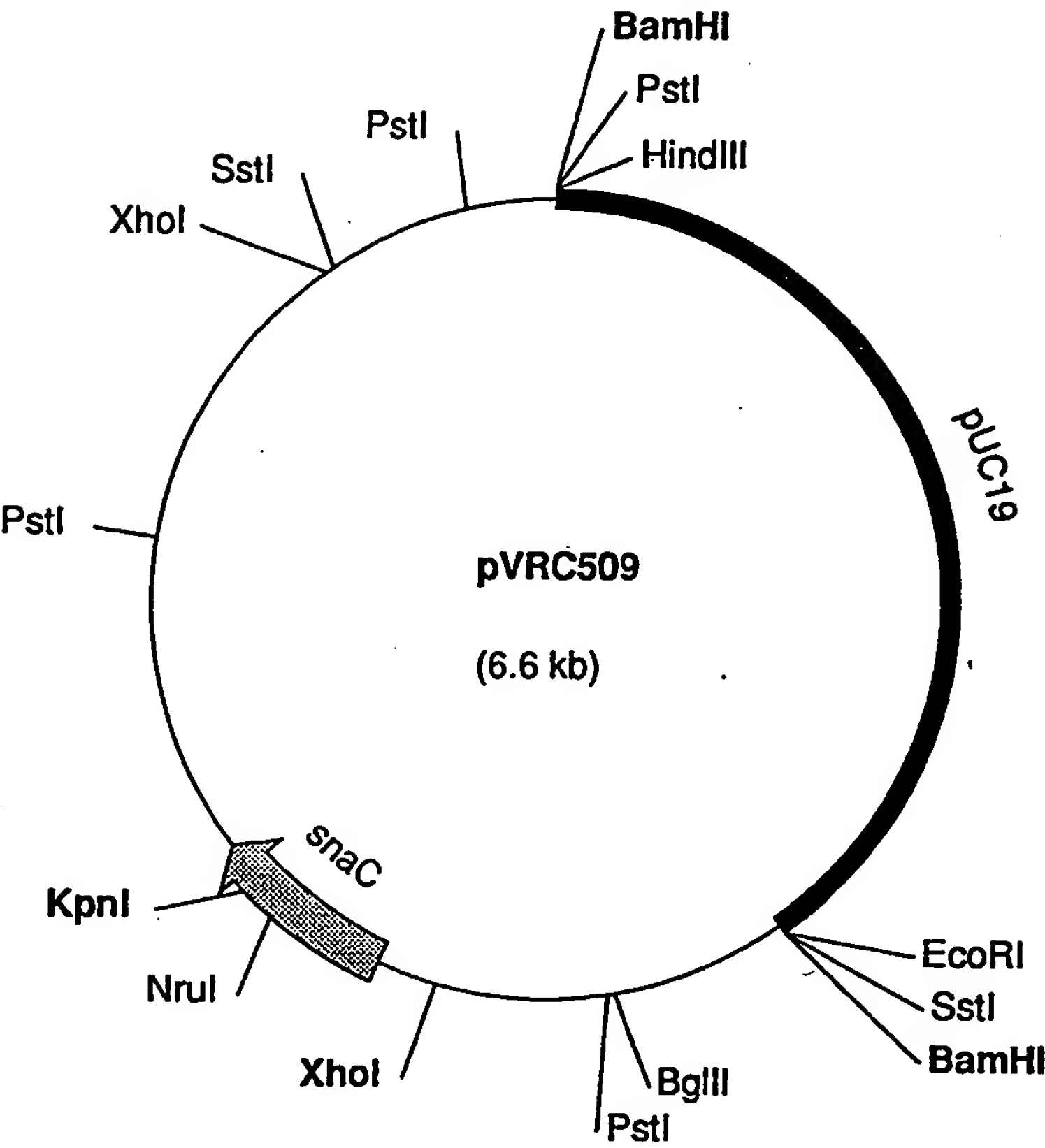


FIGURE 21



24/33

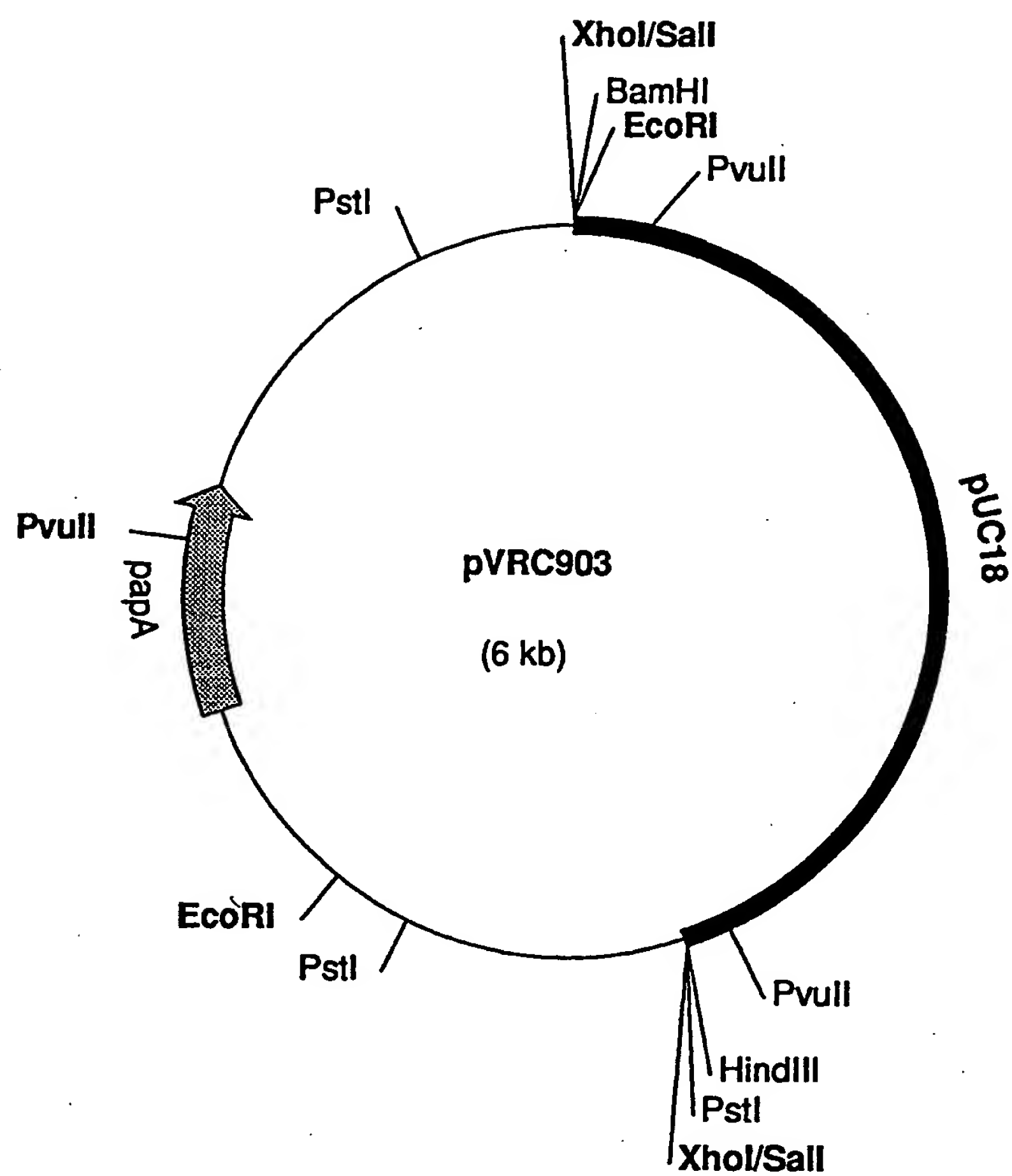


FIGURE 23

Figure 23

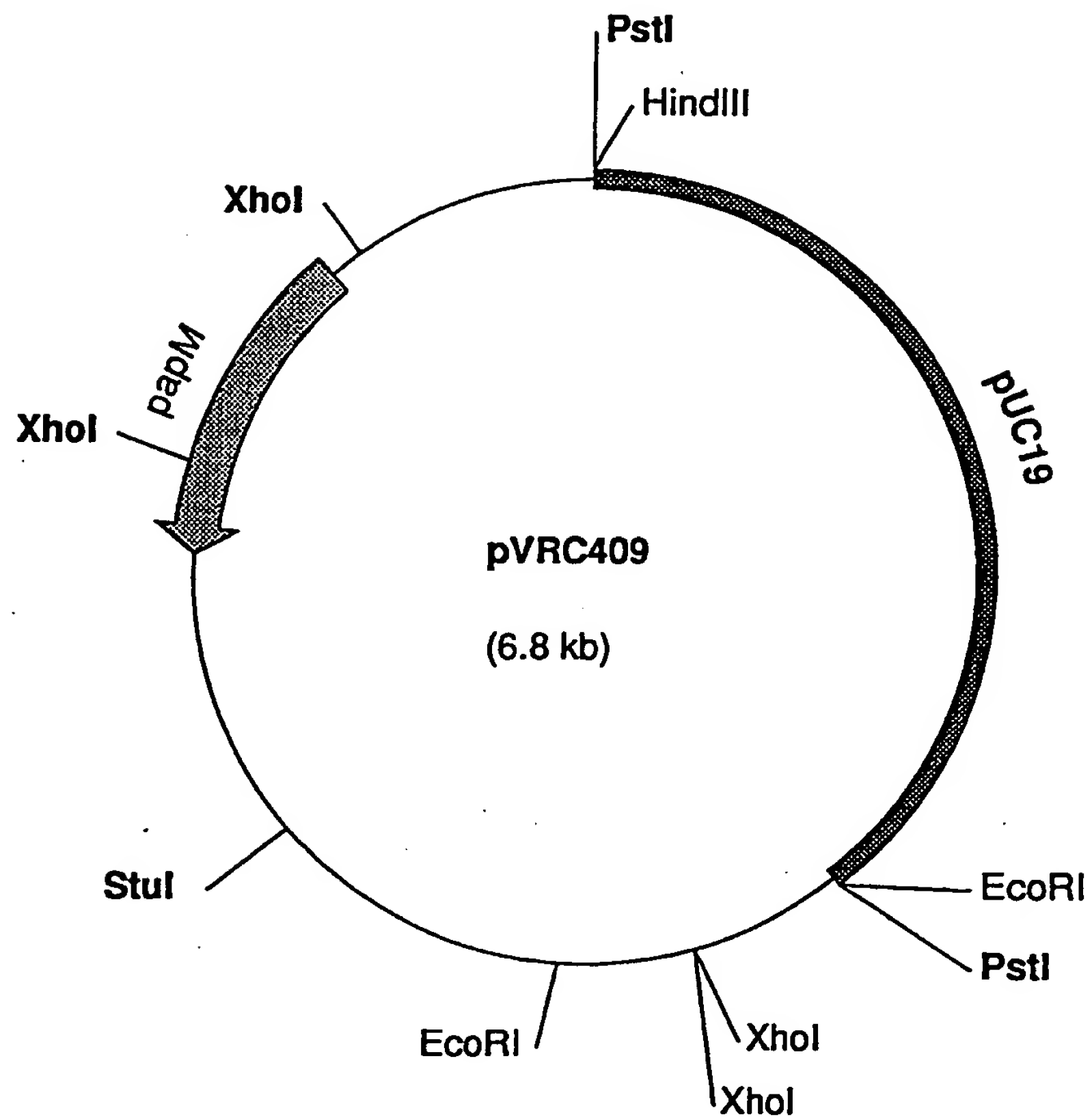


FIGURE 24

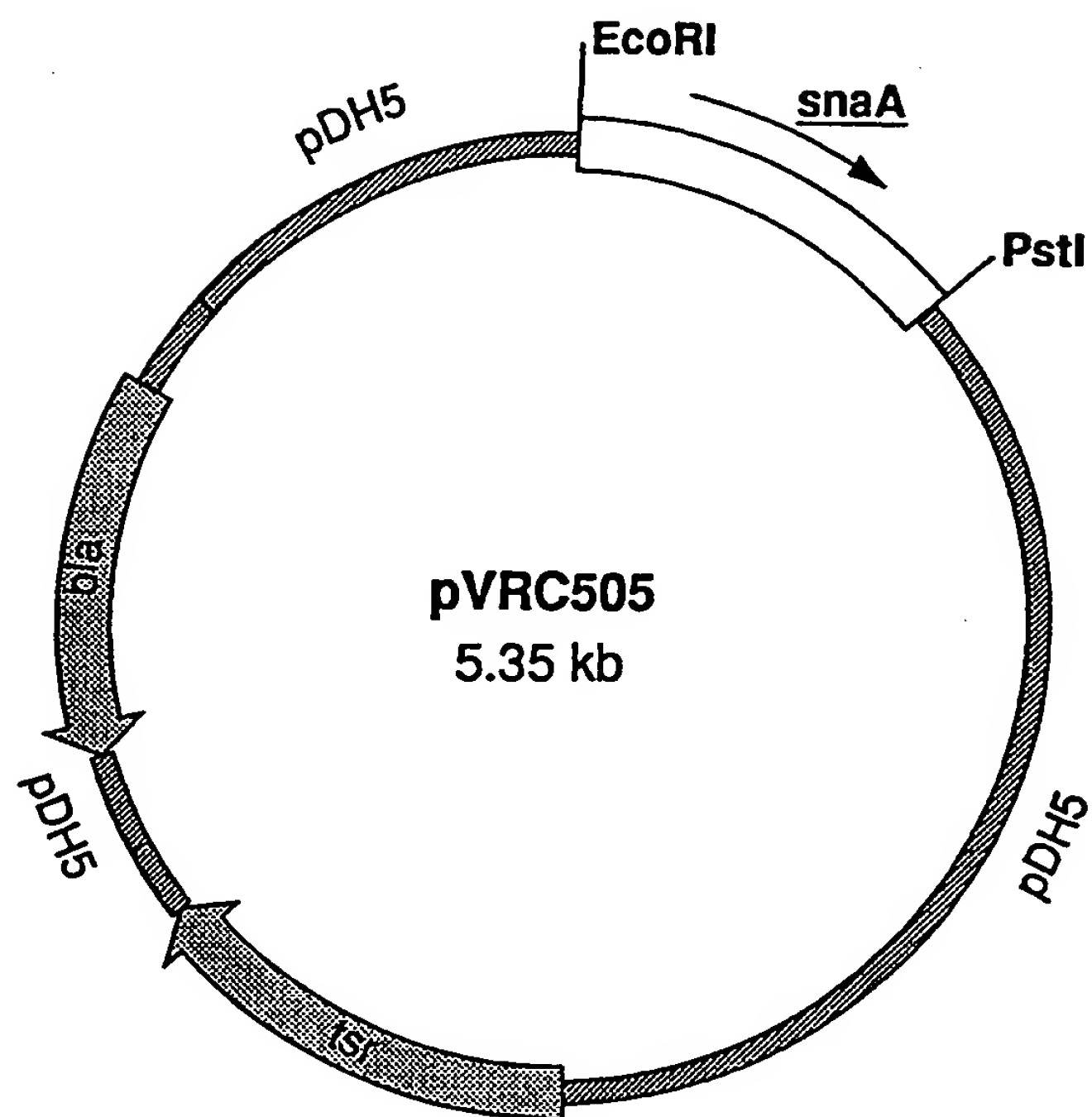


FIGURE 25

27/33

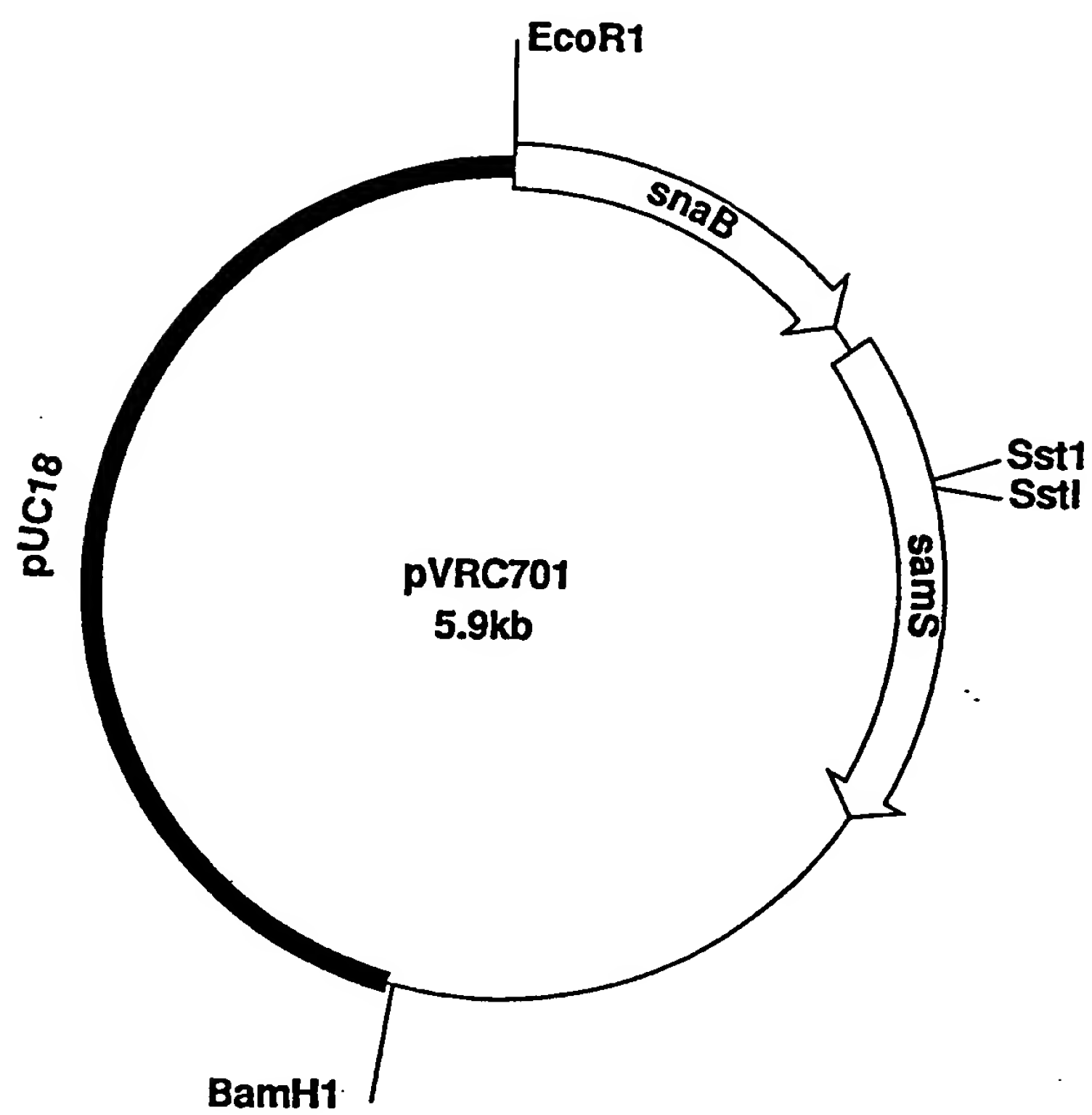


FIGURE 26

28/33

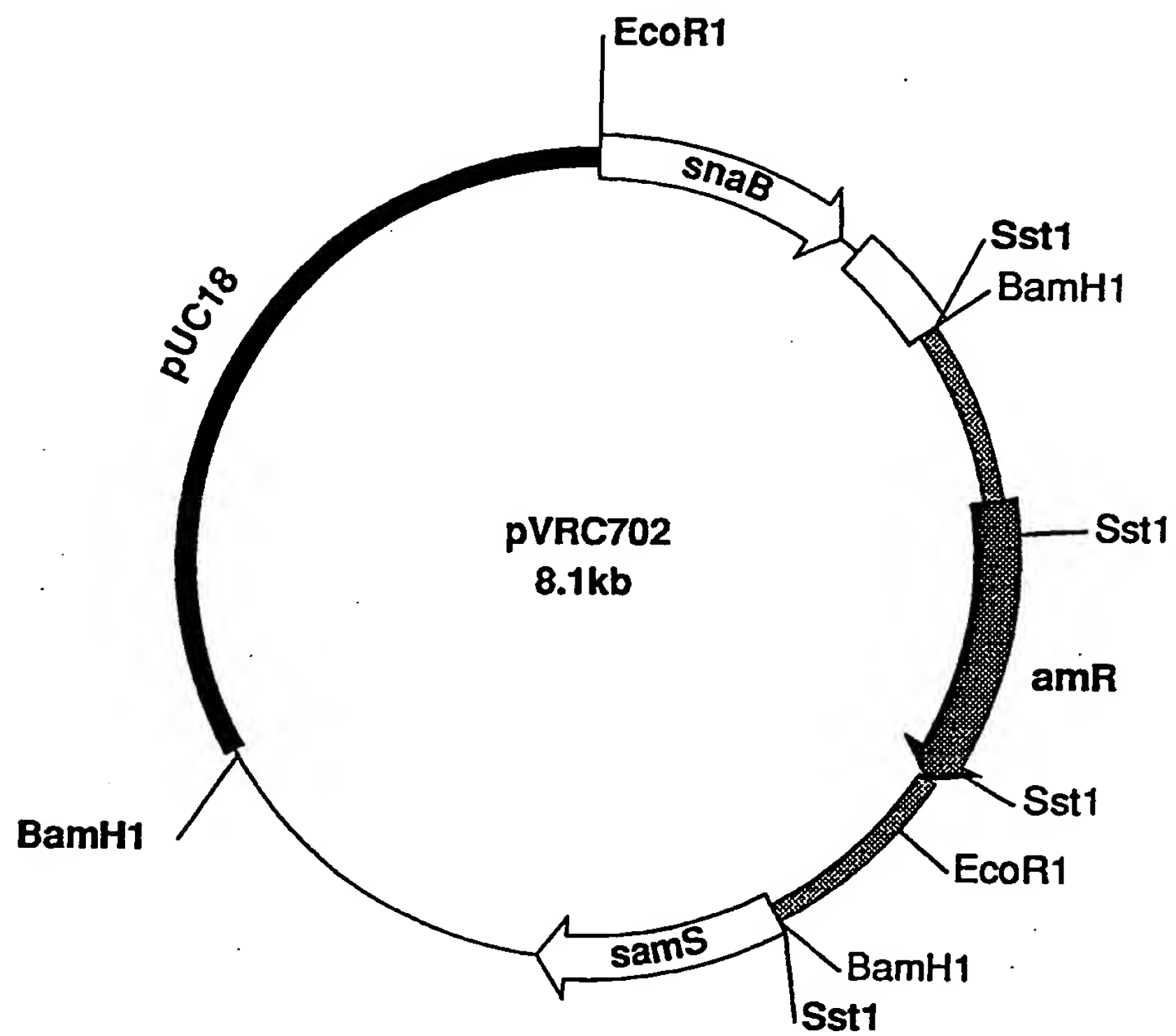


FIGURE 27

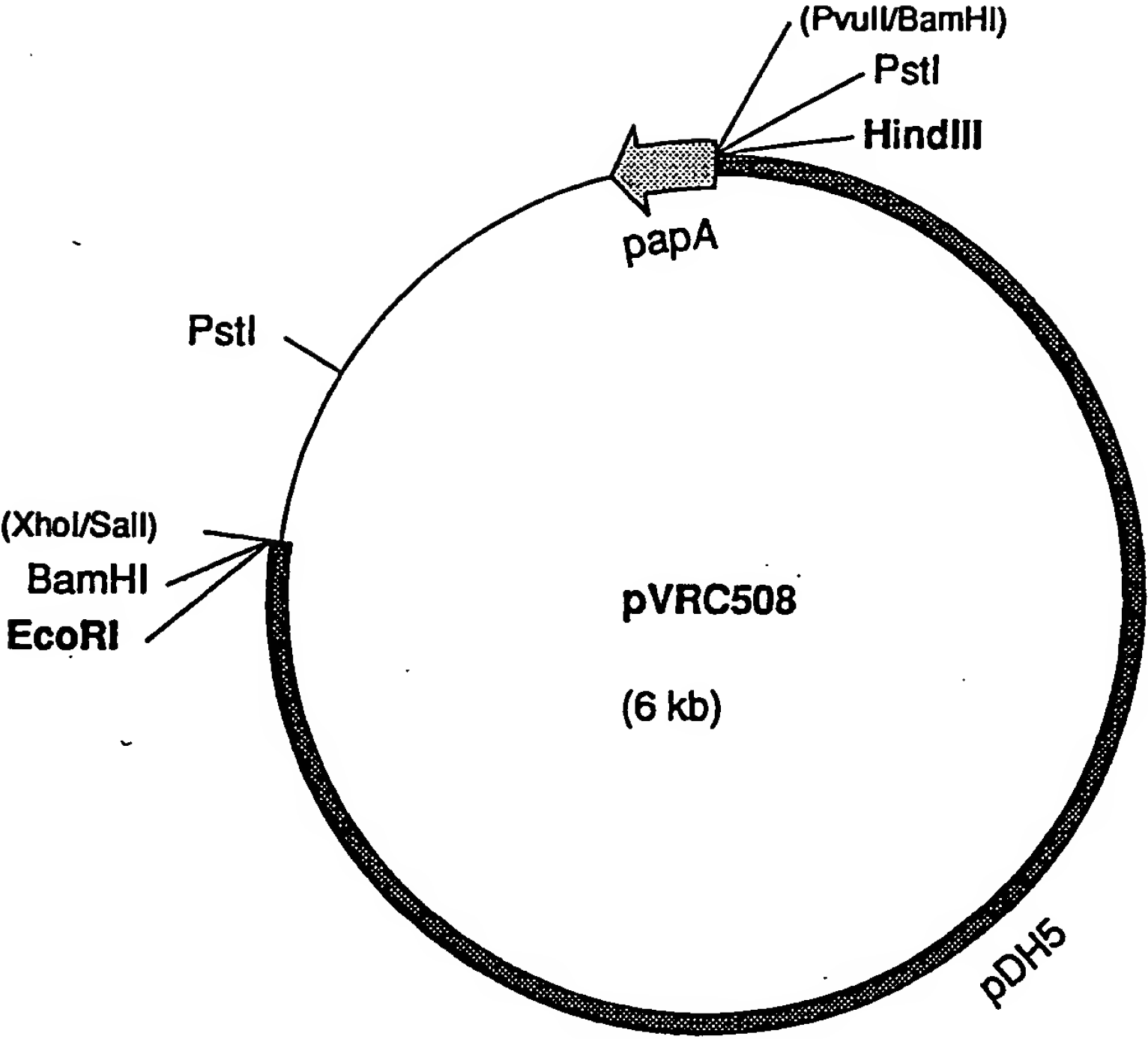


FIGURE 28

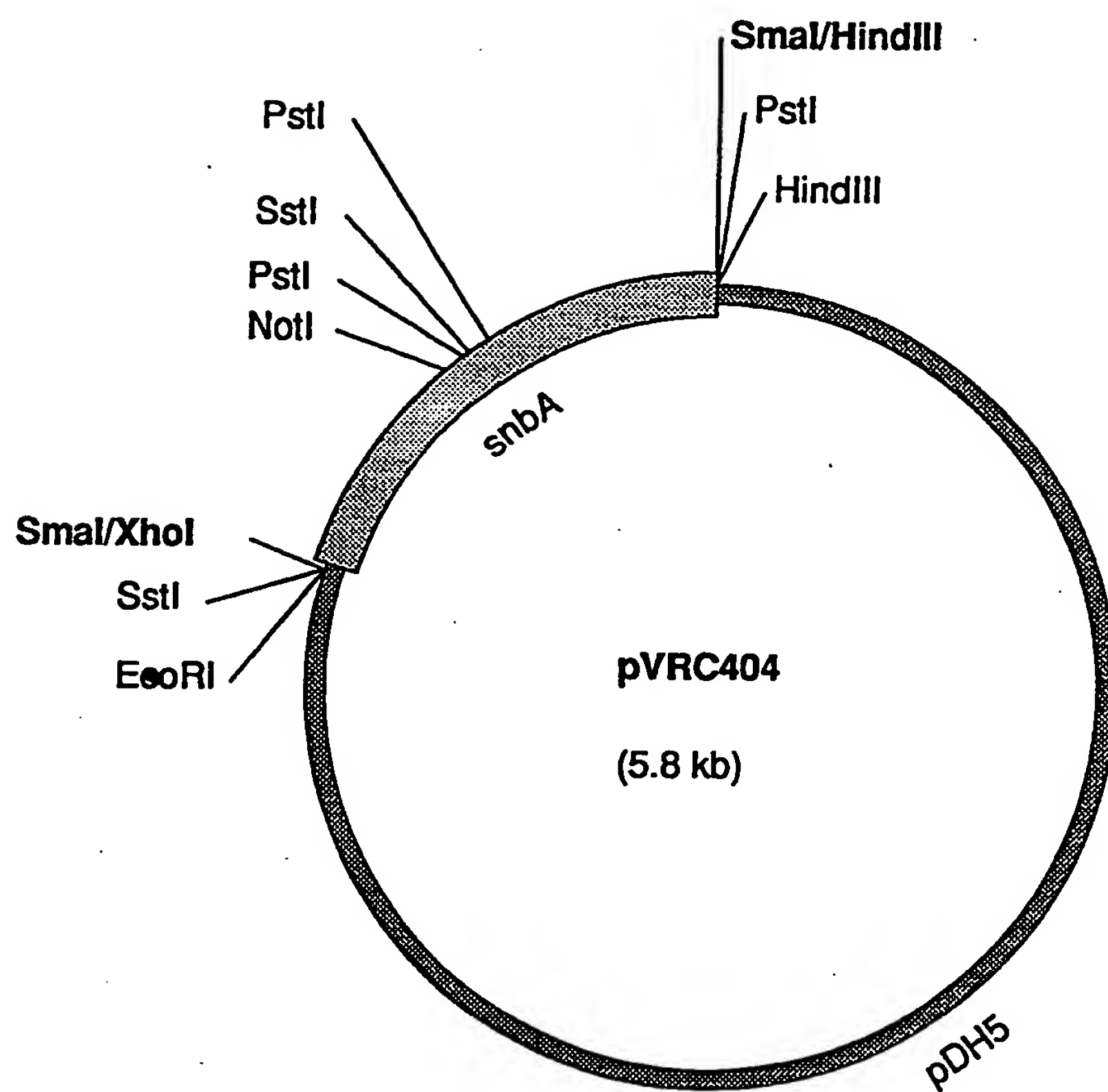


FIGURE 29

31/33

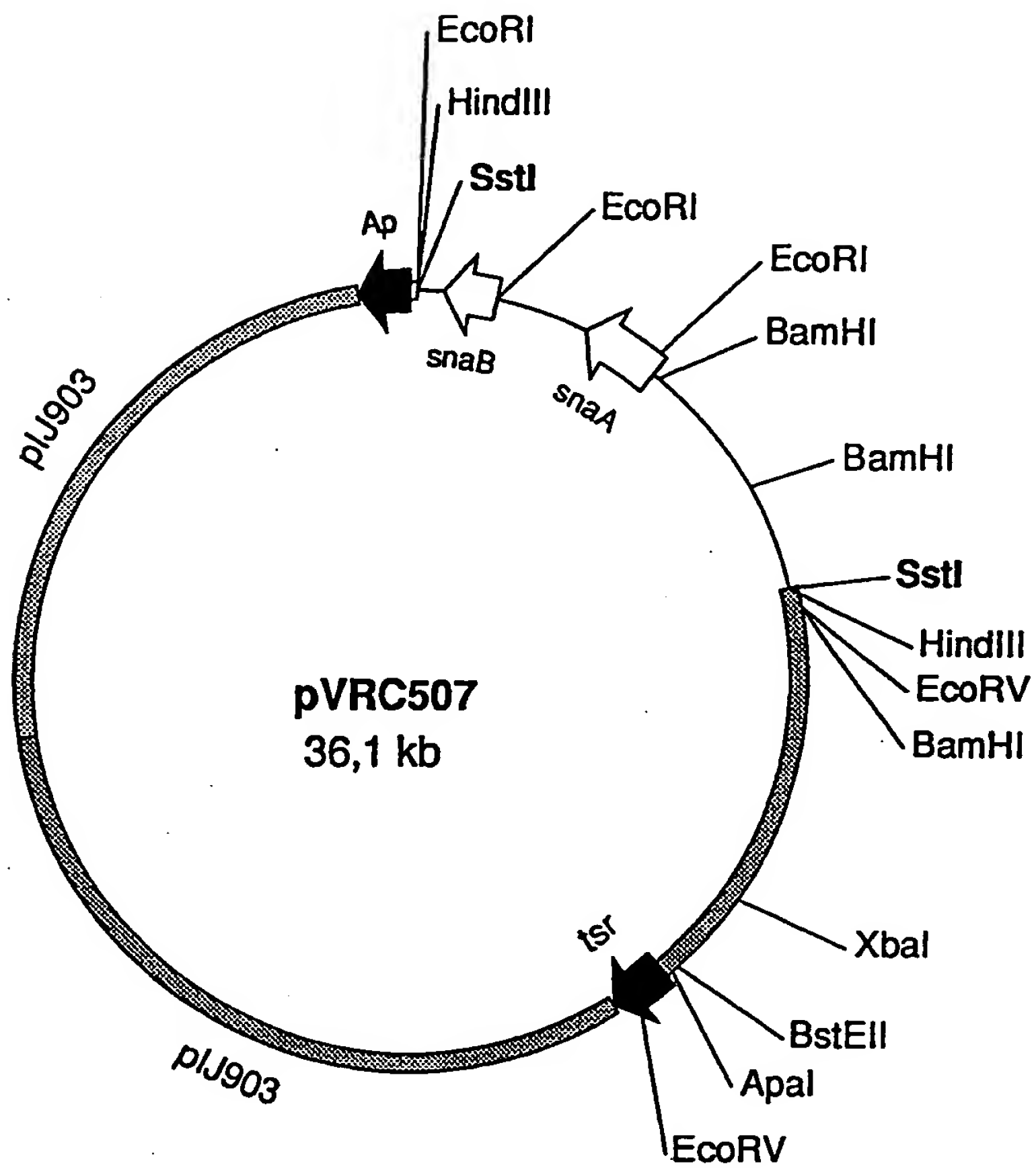


Figure 30

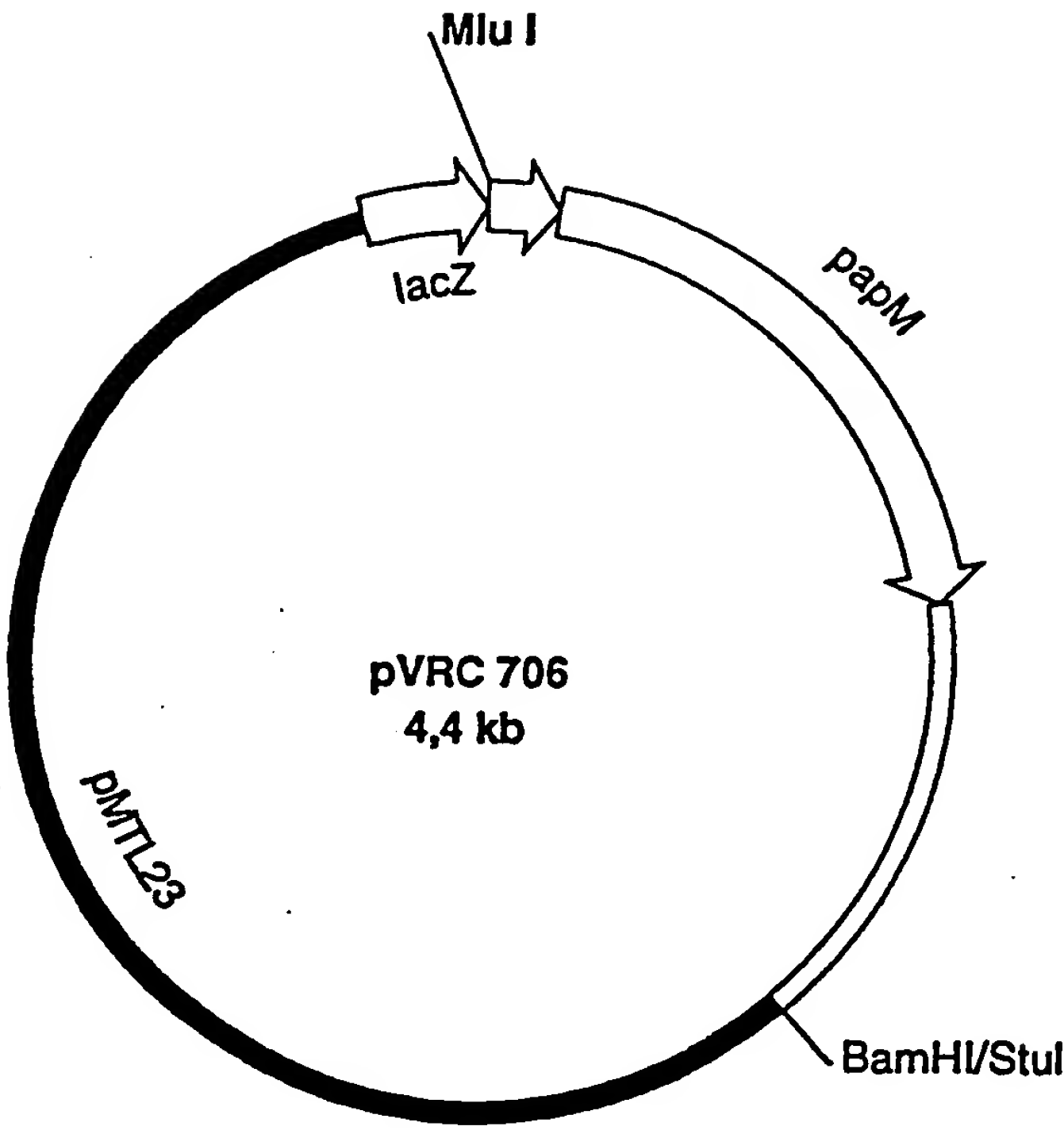


FIGURE 31

33/33

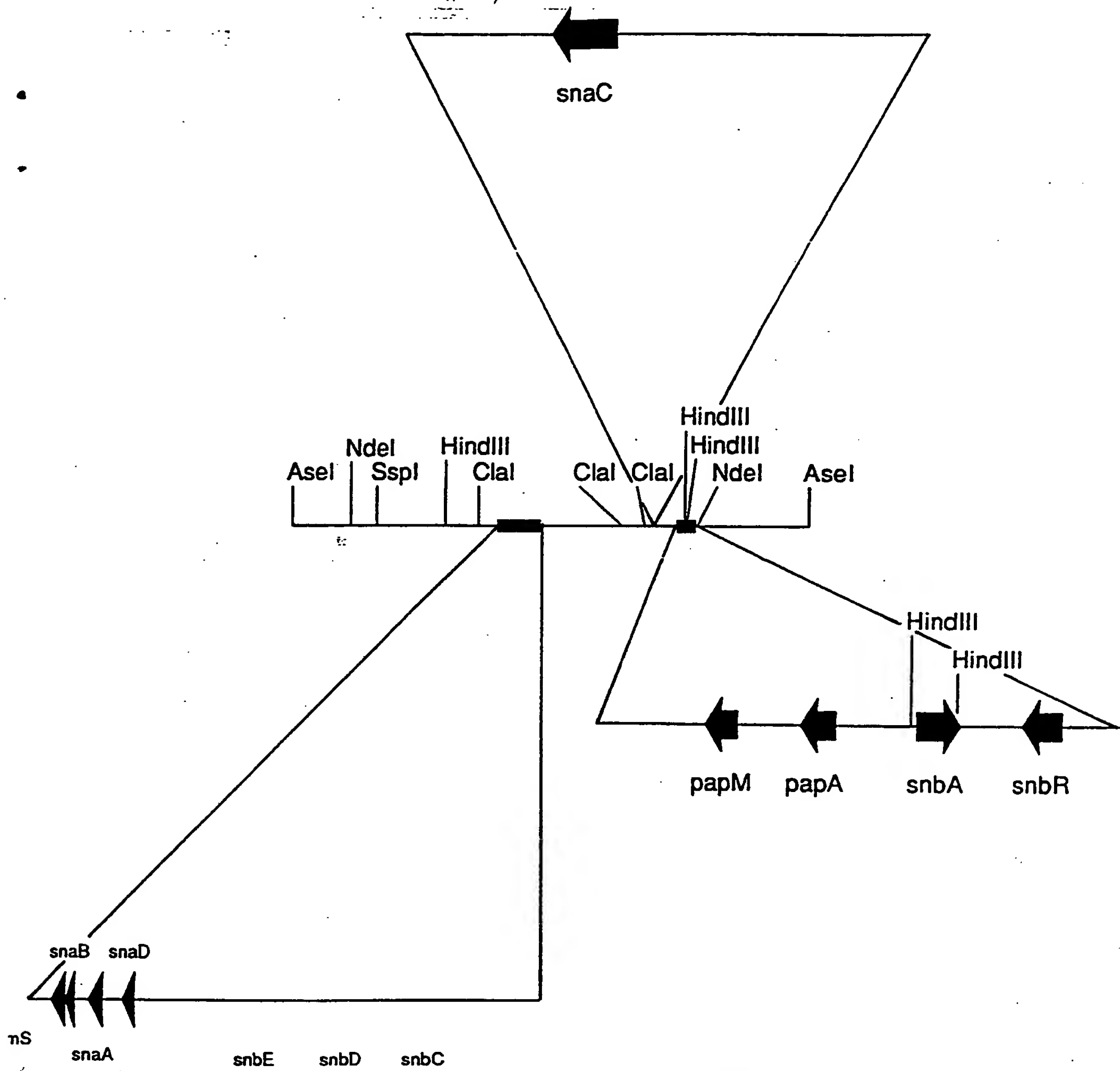


FIGURE 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/52 C12N15/76 C12N15/54 C12N1/21 C12N9/10
 C12N9/00 C12N15/53 C12N9/06 C12P21/04 C12P17/18
 //C07K7/06, C07K5/06, (C12P21/04, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOTECHNOLOGY vol. 8 , February 1990 , NEW YORK US pages 115 - 121 KEITH F. CHATER ET AL 'The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomyces' see the whole document ---	1-22
A	GENE. vol. 74 , 1988 , AMSTERDAM NL pages 305 - 320 S. E. HALLAM ET AL 'Nucleotide sequence , transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor' cited in the application --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 1994

Date of mailing of the international search report

17.02.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

LE CORNEC, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/FR 93/00923

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9 December 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 251978n, FUNANE, KAZUMI ET AL 'Isolation and properties of IMfactor (an inducer of secondary metabolite production)deficient mutants of Streptomyces virgineae MAFF 10-06014' page 453 ;column R ; see abstract & SHOKUHIN SOGO KENKYU HOKOKU vol. 55 , 1991 pages 37 - 44 ---	14-16
X	DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES vol. 22 , 1984 pages 695 - 720 A. M. BIOT 'Virginiamycin : properties , biosynthesis and fermentation' see page 703 ---	16
P,X	BIOTECHNOLOGY LETTERS vol. 14, no. 11 , November 1992 pages 1065 - 1070 V. PAQUET ET AL 'Induction of pristinamycins production in Streptomyces pristinaespiralis' see abstract ---	14-16
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8420, 4 April 1984 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 84-123313 'Selective production of neoviridogrisein II from the antibiotic producing microorganism prolyl-hydroxylase activity-defect variant' & JP,A,59 059 198 (SANRAKU OCEAN) 4 April 1984 see abstract ---	14-17
A	FOLIA MICROBIOLOGICA vol. 35, no. 6 , 1990 , PRAGUE, TCHECOSLOVAQUIE. page 494 M. BLUMAUEROVA ET AL 'Physiological and genetic aspects of Virginiamycin production' see abstract ---	16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 93/00923

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOTECHNOLOGY AND BIOINDUSTRY vol. 2 , 1988 pages 20 - 22 V.PRYKRYLOVA ET AL 'Strain developement in Streptomyces virginiae, a producer of Virginiamycin' see the whole document -----</p>	16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 93/00923

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 5 C12N15/52 C12N15/76 C12N15/54 C12N1/21 C12N9/10
C12N9/00 C12N15/53 C12N9/06 C12P21/04 C12P17/18
//C07K7/06, C07K5/06, (C12P21/04, C12R1:465)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOTECHNOLOGY vol. 8 , Février 1990 , NEW YORK US pages 115 - 121 KEITH F. CHATER ET AL 'The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomyces' voir le document en entier ---	1-22
A	GENE. vol. 74 , 1988 , AMSTERDAM NL pages 305 - 320 S. E. HALLAM ET AL 'Nucleotide sequence , transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor' cité dans la demande --- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 Janvier 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17-02-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

LE CORNEC, N

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 23, 9 Décembre 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 251978n, FUNANE, KAZUMI ET AL 'Isolation and properties of IMfactor (an inducer of secondary metabolite production)deficient mutants of Streptomyces virgineae MAFF 10-06014' page 453 ;colonne R ; voir abrégé & SHOKUHIN SOGO KENKYU HOKOKU vol. 55, 1991 pages 37 - 44 ---	14-16
X	DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES vol. 22, 1984 pages 695 - 720 A. M. BIOT 'Virginiamycin : properties , biosynthesis and fermentation' voir page 703 ---	16
P,X	BIOTECHNOLOGY LETTERS vol. 14, no. 11, Novembre 1992 pages 1065 - 1070 V. PAQUET ET AL 'Induction of pristinamycins production in Streptomyces pristinaespiralis' voir abrégé ---	14-16
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8420, 4 Avril 1984 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 84-123313 'Selective production of neoviridogrisein II from the antibiotic producing microorganism prolyl-hydroxylase activity-defect variant' & JP,A,59 059 198 (SANRAKU OCEAN) 4 Avril 1984 voir abrégé ---	14-17
A	FOLIA MICROBIOLOGICA vol. 35, no. 6, 1990, PRAGUE, TCHECOSLOVAQUIE. page 494 M. BLUMAUEROVA ET AL 'Physiological and genetic aspects of Virginiamycin production' voir abrégé ---	16

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOTECHNOLOGY AND BIOINDUSTRY vol. 2 , 1988 pages 20 - 22 V.PRYKRYLOVA ET AL 'Strain developement in Streptomyces virginiae, a producer of Virginiamycin' voir le document en entier -----	16